



*DATE*

16C1

0360

514413-3900  
PATENT

#7  
10/30/02

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

RECEIVED

OCT 30 2002

TECH CENTER 1600/2900

Applicants: Schewe et al

Serial No.: 10/038,224

Filed : October 19, 2001

For : MONOCOTYLEDON PLANT CELLS AND PLANTS WHICH SYNTHESISE  
MODIFIED STARCH

745 Fifth Avenue  
New York, New York 10151

*Fox*

*1638*

I hereby certify that this correspondence is being  
deposited with the United States Postal Service  
as first class mail in an envelope addressed to:  
Assistant Commissioner for Patents,  
Washington, D.C. 20231, on April 12, 2002

William F. Lawrence, Registration No. 28,029  
Name of Applicant, Assignee or Registered  
Representative

*W. F. Lawrence*

Signature

April 12, 2002

Date of Signature

COMMUNICATION FORWARDING PRIORITY DOCUMENT

Assistant Commissioner for Patents  
Washington, D.C. 20231

Sir:

Attached is a certified copy of German Application  
Nos. 100 64 805.3 and 100 52 492.3 on which priority is claimed.  
A claim for priority of this application was made by the  
inventors in the inventors Declaration.


514413-3900  
PATENT

Acknowledgement of receipt of the priority document is  
respectfully requested.

Respectfully submitted,

FROMMER LAWRENCE & HAUG LLP  
Attorneys for Applicant

By

  
\_\_\_\_\_  
William F. Lawrence  
Registration No. 28,029  
745 Fifth Avenue  
New York, New York 10151  
(212) 588-0800

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 100 52 492.3

**Anmeldetag:** 23. Oktober 2000

**Anmelder/Inhaber:** Aventis CropScience GmbH, Frankfurt am Main/DE

**Bezeichnung:** Monokotyledone Pflanzenzellen und Pflanzen, die eine modifizierte Stärke synthetisieren

**IPC:** C 12 N, C 15 N, A 01 H

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 02. November 2001  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
Der Präsident  
Im Auftrag

Wudsmann

## Beschreibung

- 5 Monokotyledone Pflanzenzellen und Pflanzen, die eine modifizierte Stärke synthetisieren

10 Die vorliegende Erfindung betrifft monokotyledone Pflanzenzellen und Pflanzen, die genetisch modifiziert sind, wobei die genetische Modifikation in der Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls besteht, das ein Protein mit der biologischen Aktivität eines R1-Proteins codiert. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Mittel und  
Verfahren zu deren Herstellung. Derartige Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisieren eine modifizierte Stärke, die dadurch gekennzeichnet ist, daß sie  
15 einen im Vergleich zu Stärke von entsprechenden nicht genetisch modifizierten monokotyledonen Pflanzen erhöhten Phosphatgehalt und/oder ein verändertes Phosphorylierungsmuster und/oder eine erhöhte Endviskosität im RVA-Profil und/oder eine erhöhte Gelfestigkeit im Texture Analyser aufweist. Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch die von den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und  
20 Pflanzen synthetisierte Stärke sowie Verfahren zur Herstellung dieser Stärke.

Im Hinblick auf die zunehmende Bedeutung, die pflanzlichen Inhaltsstoffen als erneuerbaren Rohstoffquellen in letzter Zeit beigemessen wird, ist es eine der  
Aufgaben der biotechnologischen Forschung, sich um eine Anpassung dieser  
25 pflanzlichen Rohstoffe an die Anforderungen der verarbeitenden Industrie zu bemühen. Um eine Anwendung von nachwachsenden Rohstoffen in möglichst vielen Einsatzgebieten zu ermöglichen, ist es darüber hinaus erforderlich, eine große Stoffvielfalt zu erreichen.

Neben Ölen, Fetten und Proteinen stellen Polysaccharide die wesentlichen  
30 nachwachsenden Rohstoffe aus Pflanzen dar. Eine zentrale Stellung bei den Polysacchariden nimmt neben Cellulose die Stärke ein, die einer der wichtigsten Speicherstoffe in höheren Pflanzen ist.

Das Polysaccharid Stärke ist ein Polymer aus chemisch einheitlichen Grundbausteinen, den Glucosemolekülen. Es handelt sich dabei jedoch um ein sehr komplexes Gemisch aus unterschiedlichen Molekülformen, die sich hinsichtlich ihres Polymerisationsgrades und des Auftretens von Verzweigungen der Glucoseketten

5 unterscheiden. Daher stellt Stärke keinen einheitlichen Rohstoff dar. Man unterscheidet zwei chemisch unterschiedliche Komponenten der Stärke: die Amylose und das Amylopektin. In typischen für die Stärkeproduktion verwendeten Pflanzen, wie z.B. Mais, Weizen oder Kartoffel, besteht die synthetisierte Stärke zu ca. 20% - 30% aus Amylose-Stärke und zu ca. 70% - 80% aus Amylopektin-Stärke.

10 Amylose wurde lange als lineares Polymer, bestehend aus  $\alpha$ -1,4-glycosidisch verknüpften  $\alpha$ -D-Glucose Monomeren, angesehen. In neueren Studien wurde jedoch die Anwesenheit von ca. 0,1%  $\alpha$ -1,6-glycosidischen Verzweigungspunkten nachgewiesen (Hizukuri und Takagi, Carbohydr. Res. 134, (1984), 1-10; Takeda et al., Carbohydr. Res. 132, (1984), 83-92). Grundsätzlich gilt jedoch, daß die

15 vollständige Trennung der Amylose vom Amylopektin sehr schwierig ist, so daß die Qualität der Amylose stark abhängt von der Art der gewählten Trennungsmethode. Im Gegensatz zur Amylose ist das Amylopektin stärker verzweigt und weist ca. 4% Verzweigungspunkte auf, die durch das Auftreten von zusätzlichen  $\alpha$ -1,6-glycosidischen Verknüpfungen zustande kommen. Das Amylopektin stellt ein

20 komplexes Gemisch aus unterschiedlich verzweigten Glucoseketten dar. Ein weiterer wesentlicher Unterschied zwischen beiden Molekülen liegt im Molekulargewicht. Während Amylose, je nach Herkunft der Stärke, ein Molekulargewicht von  $5 \times 10^5 - 10^6$  Da besitzt, liegt das des Amylopektins zwischen  $10^7$  und  $10^8$  Da. Die beiden Makromoleküle können durch ihr Molekulargewicht und

25 ihre unterschiedlichen physiko-chemischen Eigenschaften differenziert werden, was am einfachsten durch ihre unterschiedlichen Jodbindungseigenschaften sichtbar gemacht werden kann.

Ein weiterer wesentlicher Unterschied zwischen Amylose und Amylopektin liegt in den relativen Mengen an Spurenstoffen, die mit diesen Makromolekülen assoziiert

30 vorliegen können. Amylose besitzt eine hohe Affinität zu hydrophoben Molekülen. Insbesondere in Getreiden kann die Amylose mit relativ hohen Mengen an Lipiden komplexiert sein (Morrison, Cereal Foods World 40, (1995), 437-446). Amylopektin kann andererseits kovalent gebundenes anorganisches Phosphat in Form von

Stärkephosphatmonoestern enthalten, was für die Amylose bisher nicht beschrieben wurde. Hohe Gehalte an Phosphatmonoestern werden speziell in Stärken gefunden, die aus Knollenfrüchten gewonnen sind. Unter den kommerziell erhältlichen Stärken hat die Kartoffelstärke den höchsten Phosphatgehalt, der zwischen 10-30 nmol mg<sup>-1</sup>

- 5 Stärke liegen kann. In Curcuma-Arten kann der Phosphatgehalt sogar 2-4 fach höher liegen (Bay-Smidt et al., 5th ISPMP Meeting Proceedings, (1997), 741), während er in Getreiden ca. 100-fach geringer ist (Kasemsuwan und Jane, Cereal Chem. 73, (1996), 702-707). Das in Getreidestärken (monokotyledone Pflanzen) nachweisbare Phosphat liegt im Gegensatz zu den Stärken aus Knollenfrüchten, 10 Wurzeln und Hülsenfrüchten kaum in Form von Stärkemonoester-Derivaten, sondern hauptsächlich in Form von Phospholipiden vor (Jane et al., Cereal Foods World 41, (1996), 827-832).

Die funktionellen Eigenschaften der Stärke werden neben dem

- 15 Amylose/Amylopektin-Verhältnis und dem Phosphatgehalt stark beeinflusst durch das Molekulargewicht, das Muster der Seitenkettenverteilung, den Gehalt an Ionen, den Lipid- und Proteingehalt etc.. Als wichtige funktionelle Eigenschaften sind hierbei beispielsweise zu nennen die Löslichkeit, das Retrogradationsverhalten, das Wasserbindevermögen, die Filmbildungseigenschaften, die Viskosität, die 20 Verkleisterungseigenschaften, die Gefrier-Tau-Stabilität, die Säurestabilität, die Gelfestigkeit etc.. Auch die Stärkekorngröße kann für verschiedene Anwendungen von Bedeutung sein.

Der Phosphatgehalt läßt sich grundsätzlich sowohl durch gentechnische Ansätze als auch durch nachträgliche chemische Phosphorylierung nativer Stärken (s.

- 25 beispielsweise in: Starch Chemistry and Technology. Eds. R. L. Whistler, J. N. BeMiller and E. F. Paschall. Academic Press, New York, 1988, 349-364) modifizieren. Chemische Modifikationen sind jedoch in der Regel kosten- und zeitintensiv und führen zu Stärken, die sich in ihren physico-chemischen Eigenschaften von in vivo modifizierten Stärken unterscheiden können.

- 30 Da Stärken von monokotyledonen Wildtyp-Pflanzen, insbesondere von Getreidepflanzen (Weizen, Reis, Mais, Hafer, Hirse, Roggen), nur einen sehr geringen Gehalt an Phosphat in Form von Stärkephosphatmonoestern aufweisen (Lim et al. Cereal Chem. 71, (1994), 488), ist es eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, monokotyledone Pflanzen zur Verfügung zu stellen, die Stärken mit im

Vergleich zu entsprechenden Wildtyppflanzenzellen und -pflanzen erhöhtem Phosphatgehalt (Gehalt an Stärkephosphatmonoestern) und veränderten physico-chemischen Eigenschaften synthetisieren.

- 5    Somit liegt der vorliegenden Erfindung die Aufgabe zugrunde, genetisch veränderte monokotyledone Pflanzenzellen und Pflanzen zur Verfügung zu stellen, welche im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen und -Pflanzen Stärken mit veränderten strukturellen und/oder funktionellen Eigenschaften synthetisieren, sowie Stärke zur Verfügung zu stellen, welche sich in
- 10   ihren strukturellen und/oder funktionellen Eigenschaften von Stärke aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen und -Pflanzen und von chemisch modifizierter Stärke unterscheidet und somit für allgemeine und/oder spezielle industrielle Verwendungszwecke besser geeignet ist.
- 15   Diese Aufgabe wird durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen bezeichneten Ausführungsformen gelöst, denn es wurde überraschenderweise gefunden, daß die Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls in das Genom von monokotyledonen Pflanzenzellen und Pflanzen zu einer Veränderung der strukturellen und/oder funktionellen Eigenschaften der in diesen monokotyledonen
- 20   Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisierten Stärke führt.

- Die Expression des fremden Nucleinsäuremoleküls ist vor allem in stärke-speichernden Organen von monokotyledonen Pflanzen von Vorteil, insbesondere von Weizenpflanzen, und führt zu einer Erhöhung des
- 25   Phosphatgehaltes und einer Veränderung der Viskositätseigenschaften der aus den stärke-speichernden Organen isolierbaren Stärken im Vergleich zu Stärken, die man aus stärke-speichernden Organen entsprechender nicht genetisch modifizierter Wildtyppflanzen, insbesondere von Weizenpflanzen, isolieren kann. Ferner unterscheiden sich die erfindungsgemäßen Stärken von chemisch phosphorylierten
- 30   Stärken durch ein verändertes Phosphorylierungsmuster, veränderte Viskositätseigenschaften und nach Verkleisterung der Stärken und Gelbildung auch durch veränderte Gelfestigkeiten.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung monokotyledone genetisch modifizierte Pflanzenzellen, wobei die genetische Modifikation in der Einführung mindestens eines fremden Nucleinsäuremoleküls besteht und das fremde Nucleinsäuremolekül ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:

- 5 a) Nucleinsäuremolekülen, die die codierende Region der unter Seq ID No. 1 dargestellten Nucleotidsequenz umfassen;
- b) Nucleinsäuremolekülen, die ein R1-Protein aus *Solanum tuberosum* mit der unter Seq ID No. 2 angegebenen Aminosäuresequenz codieren;
- c) Nucleinsäuremolekülen, die ein Derivat der unter Seq ID No. 1 angegebenen  
10 Nucleotidsequenz darstellen; und
- d) Nucleinsäuremolekülen, die Fragmente der unter (a), (b) oder (c) genannten Nucleinsäuremoleküle darstellen.

Der Begriff "genetisch modifiziert" bedeutet im Sinne der vorliegenden Erfindung,  
15 daß die Pflanzenzelle durch Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls in ihrer genetischen Information verändert ist und daß das Vorhandensein oder die Expression des fremden Nucleinsäuremoleküls zu einer phänotypischen Veränderung führt. Der Begriff „Phänotypische Veränderung“ bedeutet dabei vorzugsweise eine meßbare Veränderung einer oder mehrerer Funktionen der  
20 Zellen. Beispielsweise zeigen die genetisch modifizierten erfindungsgemäßen Pflanzenzellen ein verändertes Expressionsmuster. Der Begriff "genetisch modifiziert" bedeutet im Sinne der vorliegenden Erfindung ferner, daß die erfindungsgemäße monokotyledone Pflanzenzelle mindestens ein fremdes Nucleinsäuremolekül stabil in dem Genom integriert enthält.

25

Unter dem Begriff "fremdes Nucleinsäuremolekül" wird im Sinne der vorliegenden Erfindung ein Nucleinsäuremolekül verstanden, das ein Protein mit der biologischen Aktivität eines R1-Proteins codiert, vorzugsweise eines aus *Solanum tuberosum*, und das natürlicherweise in entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-  
30 Pflanzenzellen nicht vorkommt. Bevorzugt ist das fremde Nucleinsäuremolekül ein rekombinantes Molekül, das aus verschiedenen Elementen besteht, dessen Kombination oder spezifische räumliche Anordnung natürlicherweise in pflanzlichen Zellen nicht auftritt. Die erfindungsgemäßen monokotyledonen Pflanzenzellen enthalten mindestens ein fremdes Nucleinsäuremolekül, wobei dieses vorzugsweise

mit regulatorischen DNA-Elementen verknüpft ist, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten, insbesondere mit einem Promotor.

Ein fremdes Nucleinsäuremolekül, das für ein R1-Protein aus *Solanum tuberosum* codiert, ist beispielsweise unter SEQ ID No.1 dargestellt. Für ein R1-Protein aus *Solanum tuberosum* codierende Nucleotidsequenzen wurden auch in der WO 97/11188 A1 sowie in Lorberth et al. (Nature Biotech. 16, (1998), 473-477) beschrieben.

Wichtige Charakteristika von R1 Proteinen aus *Solanum tuberosum* sind i) ihre Aminosäuresequenz (s. beispielsweise SEQ ID No. 2); ii) ihre Lokalisation im Stroma der Plastiden pflanzlicher Zellen, wobei sie dort sowohl in stärkekorngelagerter als auch in löslicher Form vorliegen können ; iii) ihre Fähigkeit zur Beeinflussung des Grades der Phosphorylierung der Stärke in Pflanzen. Beispielsweise führt die

Inhibierung des R1 Gens codierend für ein R1-Protein aus Kartoffel in transgenen Kartoffelpflanzen zu einer Verringerung des Phosphatgehaltes der aus den Kartoffelknollen isolierbaren Stärke. Darüberhinaus konnten Lorberth et al. zeigen, daß das R1-Protein aus *Solanum tuberosum* in der Lage ist, bakterielles Glykogen zu phosphorylieren, wenn man die korrespondierende R1 cDNA in *E. coli* exprimiert (Lorberth et al., Nature Biotech. 16, (1998), 473-477).

Ritte et al. (Plant J. 21, (2000), 387-391) konnten zeigen, daß das R1-Protein aus *Solanum tuberosum* in Kartoffelpflanzen reversibel an Stärkekörner bindet, wobei die Stärke der Bindung an das Stärkekorn abhängt vom metabolischen Status der Pflanze. In stärkekorngelagerter Form liegt das Protein in Kartoffelpflanzen vornehmlich bei Blättern vor, die im Dunklen gehalten wurden. Nach Beleuchtung der Blätter liegt das Protein dagegen hauptsächlich in der löslichen, nicht an das Stärkekorn gebundenen Form vor.

Ferner führt die Inhibierung der Expression des R1-Gens aus Kartoffel in transgenen Kartoffelpflanzen zu einem "starch-excess"-Phänotyp, d.h. die Blätter

entsprechender Pflanzen weisen einen erhöhten Gehalt an Stärke auf (Lorberth et al., Nature Biotech. 16, (1998), 473-477). Darüberhinaus zeichnen sich die Knollen solcher Kartoffelpflanzen dadurch aus, daß sie nach Kaltlagerung ein verringertes „cold-induced-sweetening“ aufweisen (Lorberth et al., Nature Biotech. 16, (1998), 473-477).

Das fremde Nucleinsäuremolekül, das für ein R1-Protein codiert, kann prinzipiell aus jeder Kartoffelsorte oder Kartoffelpflanze stammen, vorzugsweise aus Kartoffelsorten der Varietäten Tomensa, Desiree, Tempora und Thomana.

5

In einer bevorzugten Ausführungsform weist das fremde Nucleinsäuremolekül die unter SEQ ID No. 1 dargestellte Nucleotidsequenz auf.

10 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung umfaßt das fremde Nucleinsäuremolekül die codierende Region der unter SEQ ID No.1 dargestellten Nucleotidsequenz.

● In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung codiert das fremde Nucleinsäuremolekül ein R1-Protein aus *Solanum tuberosum* mit der unter SEQ ID  
15 No. 2 angegebenen Aminosäuresequenz.

In noch einer weiteren Ausführungsform der Erfindung weisen die fremden Nucleinsäuremoleküle die codierende Region des reifen (Protein ohne plastidäres Signalpeptid) Proteins (bp 447-bp 4607 der unter der SEQ ID No. 1 angegebenen  
20 Nucleotidsequenz) auf. Anstelle des plastidären N-terminalen Signalpeptids des R1-Proteins aus Kartoffel (Aminosäuren 1 bis 77 codiert durch die Nucleotide 216 bis 446 der unter SEQ ID No.1 angegebenen Nucleotidsequenz) weisen die fremden Nucleinsäuremoleküle in dieser Ausführungsform der Erfindung eine heterologe  
● plastidäre Signalsequenz auf, d.h. eine Signalsequenz, die natürlicherweise nicht in  
25 Verbindung mit dem reifen R1-Protein vorliegt. Plastidäre Signalsequenzen sind dem Fachmann bekannt.

Als plastidäre Signalsequenz kann beispielsweise die Signalsequenz der Ferredoxin:NADP<sup>+</sup> oxidoreductase (FNR) aus Spinat verwendet werden. Die Sequenz enthält den 5'-nichttranslatierten Bereich sowie die flankierende  
30 Transitpeptidsequenz der cDNA des plastidären Proteins Ferredoxin:NADP<sup>+</sup> oxidoreductase aus Spinat (Nukleotid -171 bis + 165; Jansen et al., Current Genetics 13, (1988), 517-522).

Ferner kann als Signalsequenz beispielsweise das Transitpeptid des waxy-Proteins aus Mais plus die ersten 34 Aminosäuren des reifen waxy-Proteins (Klößen et al.,

Mol. Gen. Genet. 217, (1989), 155-161) verwendet werden. Darüberhinaus kann das Transitpeptid des waxy-Proteins aus Mais verwendet werden ohne die ersten 34 Aminosäuren des reifen waxy-Proteins.

- 5 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung stellt das fremde Nucleinsäuremolekül ein Derivat der unter SEQ ID No.1 angegebenen Nukleotidsequenz dar.

Der Ausdruck „Derivat“ bedeutet im Sinne der vorliegenden Erfindung, daß die  
10 Sequenzen dieser Moleküle sich von der unter SEQ ID No. 1 angegebenen Nucleotidsequenz an einer oder mehreren Positionen unterscheiden und einen hohen Grad an Homologie zur codierenden Region der unter der SEQ ID No. 1 angegebenen Nucleotidsequenz aufweisen. Zusätzlich zeichnen sich Derivate dadurch aus, daß sie für ein Protein mit der biologischen Aktivität eines R1-Proteins,  
15 vorzugsweise eines R1-Proteins aus *Solanum tuberosum*, codieren.

„Homologie“ bedeutet im Sinne der vorliegenden Erfindung eine Sequenzidentität von Nucleotidsequenzen von mindestens 65 %, insbesondere von mindestens 85 %, insbesondere eine Identität von mindestens 90 %, vorzugsweise über 95 % und besonders bevorzugt über 98 %. Die Abweichungen zu den oben beschriebenen  
20 Nucleinsäuremolekülen können dabei durch Deletion, Addition, Substitution, Insertion oder Rekombination entstanden sein.

Vorzugsweise wird der Grad der Homologie bestimmt durch Sequenzvergleich der betreffenden Nucleotidsequenz mit der codierenden Region von SEQ ID No.1, insbesondere mit der für das reife Protein codierenden Region von SEQ ID No.1  
25 (bp447-bp4607) der SEQ ID No. 1 angegebenen Nucleotidsequenz). Weisen die zu vergleichenden Sequenzen unterschiedliche Längen auf, so bezieht sich der Grad der Homologie vorzugsweise auf den Prozentsatz an Nukleotiden in der kürzeren Nukleotidsequenz, die identisch zu den Nukleotiden der längeren Sequenz sind, d.h. die Sequenzidentität wird für den Bereich bestimmt, in dem sich die betreffenden  
30 Nucleotidsequenzen überlappen. Die Sequenzvergleiche können durchgeführt werden unter Verwendung bekannter Computerprogramme, wie z.B. dem Programm ClustalW (Thompson et al., Nucleic Acids Research 22, (1994), 4673-4680), das durch Julie Thompson (Thompson@EMBL-Heidelberg.DE) und Toby Gibson (Gibson@EMBL-Heidelberg.DE; European Molecular Biology Laboratory,

Meyerhofstrasse 1, D 69117 Heidelberg, Deutschland) vertrieben wird. Clustal W kann auch von verschiedenen Internetseiten heruntergeladen werden, wie z.B. der des IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, B.P.163, 67404 Illkirch Cedex, France; <ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/>) und der des EBI

5 (European Bioinformatics Institute) (<ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/>) sowie von verschiedenen Internet-Seiten mit Verknüpfungen zum EBI (European Bioinformatics Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB10 1SD, UK).

Bei Verwendung des ClustalW Programs (Version 1.8) werden für die verschiedenen Parameter die voreingestellten Werte (default values) verwendet. Im Falle von DNA-  
10 Sequenzvergleichen besitzen diese Parameter folgende Werte: KTUPLE=2, TOPDIAGS=4, PAIRGAP=5, DNAMATRIX:IUB, GAOPEN=10, GAPEXT=5, MAXDIV=40, TRANSITIONS: unweighted.

Im Falle von Proteinsequenzvergleichen werden ebenfalls die voreingestellten Werte (default values) für die Parameter des ClustalW Programms verwendet. Diese  
15 Parameter besitzen die folgenden Werte: KTUPLE=1, TOPDIAG=5, WINDOW=5, PAIRGAP=3, GAOPEN=10, GAPEXTEND=0.05, GAPDIST=8, MAXDIV=40, MATRIX=GONNET, ENDGAPS(OFF), NOPGAP, NOHGAP.

Der Grad der Homologie kann beispielsweise ermittelt werden unter Verwendung bekannter Computerprogramme, wie z.B. Mview  
20 (<http://www.sacs.ucsf.edu/documentation/seqsoftware/mview>; Brown, N.P., Leroy C., Sander C. (1998). MView: A Web compatible database search or multiple alignment viewer. *Bioinformatics*,14(4):380-381).

„Homologie“ bedeutet im Sinne der vorliegenden Erfindung ferner, daß funktionelle  
25 und/oder strukturelle Äquivalenz zwischen den betreffenden Nucleinsäuremolekülen oder den durch sie codierten Proteinen besteht. Bei den Nucleinsäuremolekülen, die homolog zu den unter SEQ ID No.1 beschriebenen Nucleinsäuremolekülen sind und Derivate dieser Moleküle darstellen, handelt es sich um Variationen dieser Moleküle, die Modifikationen darstellen, die dieselbe biologische Funktion ausüben, die also in  
30 vivo in der Lage sind, den Phosphatgehalt von Stärken in monokotyledonen Pflanzen zu erhöhen. Es kann sich dabei sowohl um natürlicherweise auftretende Variationen handeln, beispielsweise um Sequenzen aus anderen Kartoffelsorten, oder um Mutationen, wobei diese Mutationen auf natürliche Weise aufgetreten sein können oder durch gezielte Mutagenese eingeführt wurden.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung handelt es sich bei dem Derivat der SEQ ID No.1 um allelische Varianten des unter SEQ ID No.1 angegebenen Nucleinsäuremoleküls.

- 5 Bei den allelischen Varianten handelt es sich um natürlich auftretende Varianten, die in der Lage sind, den Phosphatgehalt von Stärken zu erhöhen.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung stellt das fremde Nucleinsäuremolekül ein Fragment der erfindungsgemäß definierten fremden  
10 Nucleinsäuremoleküle dar.

Der Begriff „Fragment“ bezeichnet im Sinne der vorliegenden Erfindung Teile des fremden Nucleinsäuremoleküls, die für einen biologisch aktiven, vorzugsweise enzymatisch aktiven, Teil des R1 Proteins codieren.

- 15 Ein biologisch aktiver Teil eines R1-Proteins zeichnet sich dadurch aus, daß er *in planta* bei Über-Expression des fremden Nucleinsäuremoleküls eine Erhöhung des Phosphatgehaltes bewirken kann und/oder daß er nach Expression in *E. coli* die Phosphorylierung von Glykogen vermittelt (s. WO 97/11188 A1, Beispiel 9).

- 20 Die von den verschiedenen Varianten (Fragmente, Derivate, allelische Varianten) der fremden Nucleinsäuremoleküle codierten Proteine weisen bestimmte gemeinsame Charakteristika auf. Dazu können z.B. gehören die biologische Aktivität, die enzymatische Aktivität, eine ähnliche Primärstruktur, die mit Hilfe der oben beschriebenen Homologievergleiche der Proteine untersucht werden kann.

- 25 Vorzugsweise weisen die Aminosäuresequenzen der Proteine zueinander eine Homologie von mindestens 60%, bevorzugt von mindestens 85%, insbesondere von mindestens 95% und besonders bevorzugt von mindestens 97% auf.

- Neben den oben beschriebenen Charakteristika können die fremden  
30 Nucleinsäuremoleküle dadurch gekennzeichnet sein, daß sie für Proteine mit der biologischen Aktivität von R1-Proteinen codieren, die mindestens eines, bevorzugt mindestens fünf, insbesondere mindestens 10 und besonders bevorzugt alle der folgenden charakteristischen Peptidmotive aufweisen:

DKAAET (SEQ ID No. 3), IADME (SEQ ID No. 4), VWMRFM (SEQ ID No. 5),  
MQEWHQ (SEQ ID No. 6), LGHYM (SEQ ID No. 7), ERGYEE (SEQ ID No.8),  
KAVLDR (SEQ ID No. 9), LSSLL (SEQ ID No. 10), IPDGAV (SEQ ID No.11),  
KVCFAT (SEQ ID No. 12), ISADEF (SEQ ID No. 13), PFGVFE (SEQ ID No. 14),  
5 SSGDD (SEQ ID No. 15), SFICKK (SEQ ID No. 16).

Die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen lassen sich von natürlicherweise  
vorkommenden Pflanzenzellen unter anderem dadurch unterscheiden, daß sie ein  
fremdes Nucleinsäuremolekül enthalten, das natürlicherweise in diesen Zellen nicht  
vorkommt oder dadurch, daß ein solches Molekül an einem Ort im Genom der Zelle  
10 integriert vorliegt, an dem es natürlicherweise nicht vorkommt, d.h. in einer anderen  
genomischen Umgebung. Ferner lassen sich derartige erfindungsgemäße transgene  
Pflanzenzellen von natürlicherweise vorkommenden Pflanzenzellen dadurch  
unterscheiden, daß sie mindestens eine Kopie des fremden Nucleinsäuremoleküls  
stabil integriert in ihrem Genom enthalten, gegebenenfalls zusätzlich zu  
15 natürlicherweise in den Zellen vorkommenden Kopien eines solchen Moleküls.  
Handelt es sich bei den in die Zellen eingeführten Nucleinsäuremolekülen um  
zusätzliche Kopien zu bereits natürlicherweise in den Zellen vorkommenden  
Molekülen, so lassen sich die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen von  
natürlicherweise vorkommenden Pflanzenzellen insbesondere dadurch  
20 unterscheiden, daß diese zusätzlichen Kopien an Orten im Genom lokalisiert sind,  
an denen sie natürlicherweise nicht vorkommen. Dies läßt sich beispielsweise mit  
Hilfe einer Southern Blot-Analyse nachprüfen.

Weiterhin lassen sich die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen von natürlicherweise  
vorkommenden Pflanzenzellen vorzugsweise durch mindestens eines der folgenden  
25 Merkmale unterscheiden: Ist das eingeführte Nucleinsäuremolekül heterolog in  
Bezug auf die Pflanzenzelle, so weisen die erfindungsgemäßen transgenen  
Pflanzenzellen Transkripte der eingeführten Nucleinsäuremoleküle auf, und zwar  
auch in solchen Organen, in denen bei Wildtyppflanzen keine Transkripte  
nachzuweisen sind. Die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen enthalten vorzugsweise  
30 Transkripte der fremden Nucleinsäuremoleküle. Diese lassen sich z. B. durch  
Northern-Blot-Analyse nachweisen. Vorzugsweise enthalten die erfindungsgemäßen  
Pflanzenzellen ein Protein, das durch ein eingeführtes fremdes Nucleinsäuremolekül  
codiert wird. Dies zusätzliche Protein kann z. B. durch immunologische Methoden,  
insbesondere durch eine Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform weisen die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und Pflanzen eine erhöhte biologische Aktivität von R1-Protein im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen und Wildtyp-Pflanzen auf.

Eine „erhöhte biologische Aktivität von R1-Protein“ kann im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung beispielsweise bestimmt werden durch Messung des Phosphatgehaltes der Stärken, die in den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisiert werden. Im Vergleich zu Stärken aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen zeichnen sich die Stärken der erfindungsgemäßen Pflanzenzellen, die eine erhöhte biologische Aktivität an R1-Protein aufweisen, dadurch aus, daß sie eine Stärke mit erhöhtem Phosphatgehalt, vorzugsweise einem erhöhten Phosphatgehalt in C6-Position der Glukosemonomere, synthetisieren.

Ferner kann eine erhöhte biologische Aktivität von R1-Protein bestimmt werden durch Messung der Menge an R1-Transkripten, z.B. durch Northern-Blot-Analyse, im Vergleich zur Menge an R1-Transkripten von entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyppflanzen.

Ferner kann eine erhöhte biologische Aktivität von R1-Protein bestimmt werden durch Messung der Menge an R1-Protein, z.B. durch Western-Blot-Analyse, im Vergleich zur Menge an R1-Protein von entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyppflanzen.

Es wurde gefunden, daß die erfindungsgemäßen monokotyledonen Pflanzenzellen eine Stärke mit erhöhtem Phosphatgehalt in C6-Position der Glukosemonomere und/oder verändertem Phosphorylierungsmuster und/oder veränderten Viskositätseigenschaften synthetisieren im Vergleich zu Stärke aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyp-Pflanzen.

Vorzugsweise betrifft die vorliegende Erfindung daher erfindungsgemäße Pflanzenzellen, die eine Stärke synthetisieren, die im Vergleich zu Stärke aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen einen erhöhten Phosphatgehalt in C6-Position der Glukosemonomere und/oder ein verändertes Phosphorylierungsmuster und/oder veränderte Viskositätseigenschaften aufweist im

Vergleich zu Stärke aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen von Wildtyp-Pflanzen.

Der Begriff „Phosphatgehalt“ der Stärke bezeichnet im Sinne der vorliegenden

- 5 Erfindung den Gehalt an kovalent in Form von Stärkephosphatmonoestern gebundenem Phosphat.

Unter dem Begriff „C6-Position“ versteht man im Sinne der vorliegenden Erfindung die Phosphatgruppen, die an Kohlenstoffatomposition „6“ der Glukosemonomere der

- 10 Stärke gebunden sind.

Unter einem "erhöhten Phosphatgehalt in C6-Position" versteht man im

- 15 Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung, daß mittels eines optisch-enzymatischen Tests (Nielsen et al., Plant Physiol. 105, (1994), 111-117, s. Methoden) in C6-Position der Glukosemonomere Phosphatgruppen nachweisbar sind, vorzugsweise versteht man unter einem "erhöhten Phosphatgehalt in C6-Position" eine Erhöhung des Phosphatgehaltes der Stärke in C6-Position des Glukosemonomers um mindestens 20%, bevorzugt um mindestens 50% und besonders bevorzugt um mindestens 100% im Vergleich zum Phosphatgehalt von
- 20 Stärke aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzen. Grundsätzlich können in der Stärke in vivo die Positionen C2, C3 und C6 der Glukoseeinheiten phosphoryliert sein. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung kann die Bestimmung des Phosphatgehaltes in C6-Position (= C6-P-Gehalt) über eine Glukose-6-phosphat-Bestimmung mittels eines optisch-
- 25 enzymatischen Tests (Nielsen et al., Plant Physiol. 105, (1994), 111-117) erfolgen (siehe Methoden).

Der Begriff „verändertes Phosphorylierungsmuster“ bedeutet im Sinne der

- 30 vorliegenden Erfindung, daß der Gesamtposphatgehalt der kovalent an die Stärke gebundenen Phosphatgruppen innerhalb der verschiedenen Schichten des Stärkekorns im Vergleich zu chemisch phosphorylierten Stärken, die aus Stärken von entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzen hergestellt wurden, verändert ist. Chemisch phosphorylierte Stärken zeichnen sich durch einen Phosphat-Gradienten innerhalb des Stärkekorns aus, wobei die äußeren Schichten

des Stärkekorns in der Regel stärker phosphoryliert sind als die inneren Schichten. Im Gegensatz dazu unterscheiden sich die erfindungsgemäßen Stärken dadurch, daß sich die Phosphatgruppen anders über die verschiedenen Schichten des Stärkekorns verteilen, d.h. die erfindungsgemäßen Stärken können dadurch gekennzeichnet sein, daß sie den für chemisch phosphorylierte Stärken typischen Gradienten von außen nach innen nicht aufweisen.

Methoden zur Untersuchung des Phosphorylierungsmusters der Stärke sind dem Fachmann bekannt (s. beispielsweise Jane und Shen, Carbohydrate Research 247, (1993), 279-290; Gough and Pybus, Staerke 25, (1973), 123-130). Diese Methoden basieren auf einer stufenweisen chemischen Verkleisterung der verschiedenen Schichten des Stärkekorns, bei der die verkleisterten Schichten des Stärkekorns schrittweise mechanisch entfernt werden. Nach dieser Schälung erfolgt die Bestimmung des Gesamtposphatgehaltes der verschiedenen Stärkekornschichten mittels Standardmethoden.

Unter dem Begriff „chemisch phosphorylierte Stärke“ soll im Sinne der vorliegenden Erfindung eine Stärke verstanden werden, die durch chemische Phosphorylierung nativer Stärke aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzenzellen und/oder Pflanzen hergestellt wurde. Vorzugsweise wird bei der chemischen Phosphorylierung nativer Stärken der Phosphatgehalt in C6-Position durch die Wahl geeigneter Versuchsbedingungen so eingestellt, daß der Phosphatgehalt in C6-Position der chemisch phosphorylierten Stärke dem Phosphatgehalt in C6-Position der Glukosemonomere der erfindungsgemäßen Stärken gleicht und/oder vergleichbar ist.

Unter dem Begriff "veränderte Viskositätseigenschaften" versteht man im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung insbesondere eine Erhöhung der Endviskosität.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform synthetisieren die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen eine Stärke, die im Vergleich zu Stärke aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyppflanzen eine erhöhte Endviskosität aufweist.

Unter dem Begriff der „Endviskosität“ versteht man im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung die Viskosität, die sich aus einem Viskositätsprofil ermitteln läßt (s. Figur 1) und dort als "Final viscosity = Fin" bezeichnet ist. Das

- 5 Viskositätsprofil kann mittels eines Rapid Visco Analysers (RVA) (Newport Scientific Pty Ltd, Investment Support Group, Warriewood, NSW 2102, Australien) gewonnen werden. Die Erstellung des Viskositätsprofils erfolgt bei der Analyse von Weizenstärken nach dem folgenden Protokoll: 2.5 g Stärke (Trockensubstanz) werden in 25 ml H<sub>2</sub>O aufgenommen und für die Analyse in einem Rapid Visco
- 10 Analyser (Newport Scientific Pty Ltd., Investment Support Group, Warriewood NSW 2102, Australien) verwendet. Der Betrieb des Gerätes erfolgt nach den Angaben des Herstellers. Das vollständige Temperaturprogramm ist in Figur 1 in schematischer Weise dargestellt. Die Durchführungs der RVA-Analyse wird weiter unten (s. Methoden) beschrieben.

15

Der Begriff "erhöhte Endviskosität" bedeutet im Sinne der vorliegenden Erfindung, daß die Endviskosität im Vergleich zu Stärken aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen um mindestens 10%, bevorzugt um mindestens 30%, insbesondere um mindestens 50% und besonders bevorzugt um mindestens

20 80% erhöht ist, wobei die Endviskosität im Vergleich zu Stärken aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen um höchstens 500%, insbesondere um höchstens 250% erhöht sein kann.

25

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung erfindungsgemäße Pflanzenzellen, die eine Stärke synthetisieren, die nach Verkleisterung ein Gel bildet, das im Vergleich zu einem Gel aus Stärke von entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen eine erhöhte Gelfestigkeit aufweist.

30

Unter dem Begriff „erhöhte Gelfestigkeit“ versteht man im Sinne der vorliegenden Erfindung eine Erhöhung der Gelfestigkeit um mindestens 20%, insbesondere um mindestens 50%, bevorzugt um mindestens 80% und besonders bevorzugt um mindestens 100%, maximal um höchstens 500% oder um höchstens 250% im

Vergleich zur Gelfestigkeit von Stärke aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen.

Die Bestimmung der Gelfestigkeit kann im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung mit Hilfe eines Texture Analyzers unter den unten beschriebenen

5 Bedingungen erfolgen (s. Methoden).

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung kann sich die Erhöhung des Phosphatgehaltes der Stärken auf die Amylopektinkomponente der Stärke beziehen.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch erfindungsgemäße Pflanzenzellen, die  
10 eine Stärke synthetisieren, deren Amylopektinkomponente phosphoryliert ist und deren Amylosekomponente im Vergleich zur Amylosekomponente von entsprechenden chemisch phosphorylierten Stärken gleichen Phosphatgehaltes in C6-Position der Glukosemonomere einen verringerten Gesamtposphatgehalt aufweist.

15 D. h., im Gegensatz zu chemisch phosphorylierten Stärken gleichen Phosphatgehaltes in C6-Position der Glukosemonomere können sich die Stärken der erfindungsgemäßen Pflanzenzellen dadurch auszeichnen, daß die Amylosekomponente der Stärke der erfindungsgemäßen Pflanzenzellen im Vergleich zur Amylosekomponente chemisch phosphorylierter Stärke gleichen  
20 Phosphatgehaltes in C6-Position der Glukosemonomere, die aus Stärke von entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzen hergestellt wurde, einen verringerten Gesamtposphatgehalt aufweist.

Unter dem Begriff des „Gesamtposphatgehalt“ der Stärke versteht man im  
25 Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung den Gehalt an kovalent in Form von Stärkephosphatmonoestern gebundenem Phosphat in C2-, C3- und C6-Position der Glukoseeinheiten. Der Gehalt an phosphorylierten Nicht-Glukanen, wie z.B. Phospholipiden, ist erfindungsgemäß von dem Begriff „Gesamtposphatgehalt“ nicht umfaßt. Phosphorylierte Nicht-Glukane müssen daher vor Bestimmung des  
30 Gesamtposphatgehaltes quantitativ abgetrennt werden.

Verfahren zur Trennung der phosphorylierten Nicht-Glukane (z.B. Phospholipide) von der Stärke sind dem Fachmann bekannt.

Unter dem Begriff „verringertes Gesamtphosphatgehalt“ soll im Sinne der vorliegenden Erfindung eine Verringerung des Gesamtphosphatgehaltes verstanden werden um mindestens 5%, insbesondere um mindestens 20%, bevorzugt um mindestens 50% und besonders bevorzugt um mindestens 80% im Vergleich zum Gesamtphosphatgehalt der Amylosekomponente einer chemisch phosphorylierten Stärke gleichen C6-Phosphatgehaltes, die aus Stärke von entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzen hergestellt wurde.

Methoden zur Bestimmung des Gesamtphosphatgehaltes sind dem Fachmann bekannt und sind unten beschrieben (s. Methoden).

Unter dem Begriff der „Amylopektinkomponente“ soll im Sinne der vorliegenden Erfindung das Amylopektin der Stärke verstanden werden.

Unter dem Begriff der „Amylosekomponente“ soll im Sinne der vorliegenden Erfindung die Amylose der Stärke verstanden werden.

Verfahren zur Trennung von Amylose und Amylopektin sind dem Fachmann bekannt.

Die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen stammen aus monokotyledonen Pflanzen. Bevorzugt handelt es sich um Pflanzenzellen aus landwirtschaftlichen Nutzpflanzen, d.h. aus Pflanzen, die vom Menschen kultiviert werden für Zwecke der Ernährung oder für technische, insbesondere industrielle Zwecke. Vorzugsweise betrifft die Erfindung somit Pflanzenzellen aus stärke-synthetisierende bzw. stärke-speichernde Pflanzen, wie z.B. aus Roggen, Gerste, Hafer, Weizen, Hirse, Reis, Mais.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung stammen die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen aus einer Pflanze der Gruppe bestehend aus Weizen, Reis, Gerste, Hafer, Roggen und Mais. Bevorzugt sind Pflanzenzellen aus Weizen-, Reis- und Maispflanzen, besonders bevorzugt aus Weizenpflanzen.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform synthetisieren die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen eine Stärke, die in C6-Position der Glukosemonomere einen Phosphatgehalt von mindestens 0.1 nmol C6-P mg<sup>-1</sup>

- Stärke, insbesondere von mindestens  $0.5 \text{ nmol C6-P mg}^{-1}$ , bevorzugt von mindestens  $1 \text{ nmol C6-P mg}^{-1}$  Stärke, besonders bevorzugt von mindestens  $2 \text{ C6-P nmol mg}^{-1}$  Stärke, insbesondere von mindestens  $5 \text{ nmol C6-P mg}^{-1}$  Stärke, ganz besonders bevorzugt von mindestens  $10 \text{ nmol C6-P mg}^{-1}$  Stärke, wobei die
- 5 erfindungsgemäßen Pflanzenzellen eine Stärke synthetisieren, die in C6-Position der Glukosemonomere einen Phosphatgehalt von höchstens  $100 \text{ nmol C6-P mg}^{-1}$  Stärke aufweist, insbesondere von höchstens  $50 \text{ nmol C6-P mg}^{-1}$  Stärke und von höchstens  $25 \text{ nmol C6-P mg}^{-1}$  Stärke.
- 10 In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung können die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen eine Stärke synthetisieren, die in C6-Position der Glukosemonomere einen Phosphatgehalt von mindestens  $15 \text{ C6-P nmol mg}^{-1}$  Stärke aufweist, wobei die
- erfindungsgemäßen Pflanzenzellen eine Stärke synthetisieren, die in C6-Position der Glukosemonomere einen Phosphatgehalt von höchstens  $100 \text{ nmol C6-P mg}^{-1}$
- 15 Stärke aufweist, insbesondere von höchstens  $50 \text{ nmol C6-P mg}^{-1}$  Stärke und von höchstens  $25 \text{ nmol C6-P mg}^{-1}$  Stärke.

- In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen Pflanzenzelle, worin eine Zelle einer
- 20 monokotyledonen Pflanze genetisch modifiziert wird, wobei die genetische Modifikation in der Einführung mindestens eines fremden Nucleinsäuremoleküls besteht.

- Für den Transfer von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle stehen eine Vielzahl von
- 25 Techniken zur Verfügung. Diese Techniken umfassen die Transformation pflanzlicher Zellen mit T-DNA unter Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* als Transformationsmittel, die Fusion von Protoplasten, die Injektion, die Elektroporation von DNA, die Einbringung der DNA mittels des biolistischen Ansatzes sowie weitere Möglichkeiten.
- 30 Die Verwendung der Agrobakterien-vermittelten Transformation von Pflanzenzellen ist intensiv untersucht und ausreichend in EP 120516; Hoekema, IN: The Binary Plant Vector System Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblasterdam (1985), Chapter V; Fraley et al., Crit. Rev. Plant Sci. 4, 1-46 und An et al. EMBO J. 4, (1985), 277-287

beschrieben worden. Für die Transformation von Kartoffel, siehe z.B. Rocha-Sosa et al., EMBO J. 8, (1989), 29-33.).

Die Transformation monokotyler Pflanzen erfolgt inzwischen routinemäßig mittels des biolistischen Ansatzes und mittels Agrobakterien (Komari et al., (1998),

- 5 Advances in cereal gene transfer; Current Opinion in Plant Biotechnology 1, S. 161 ff.; Bilanz et al. (1999), Transformation of Cereals, Genetic Engineering, 12, S. 113-148 Hrsg.: JK Setlow, Kluwer Academic / Plenum Publisher, New York).

- Agrobakterium-basierende Vektoren wurden beschrieben (Chan et al., Plant Mol. Biol. 22, (1993), 491-506; Hiei et al., Plant J. 6, (1994) 271-282; Deng et al, Science  
10 in China 33, (1990), 28-34; Wilmink et al., Plant Cell Reports 11, (1992), 76-80; May et al., Bio/Technology 13, (1995), 486-492; Conner und Domisse, Int. J. Plant Sci. 153 (1992), 550-555; Ritchie et al, Transgenic Res. 2, (1993), 252-265). Alternative Systeme zur Transformation von monokotylen Pflanzen sind die Transformation mittels des biolistischen Ansatzes (Wan und Lemaux, Plant Physiol. 104, (1994), 37-  
15 48; Vasil et al., Bio/Technology 11 (1993), 1553-1558; Ritala et al., Plant Mol. Biol. 24, (1994), 317-325; Spencer et al., Theor. Appl. Genet. 79, (1990), 625-631), die Protoplastentransformation, die Elektroporation von partiell permeabilisierten Zellen, die Einbringung von DNA mittels Glasfasern. Insbesondere die Transformation von Mais wird in der Literatur mehrfach beschrieben (vgl. z. B. WO 95/06128, EP  
20 0513849, EO 0465875, EP 292435; Fromm et al., Biotechnology 8, (1990), 833-844; Gordon-Kamm et al., Plant Cell 2, (1990), 603-618; Koziel et al., Biotechnology 11 (1993), 194-200; Moroc et al., Theor. Appl. Genet. 80, (1990), 721-726). Auch die erfolgreiche Transformation anderer Getreidearten wurde bereits  
beschrieben, z.B. für Gerste (Wan und Lemaux, s.o.; Ritala et al., s.o.; Krens et al.,  
25 Nature 296, (1982), 72-74) und für Weizen (Becker et al., Plant J. 5 (2), (1994), 229-307; Nehra et al., Plant J. 5, (1994), 285-297).

- Für Reis wurden unterschiedliche Transformationsmethoden beschrieben, wie z.B. die Agrobakterium-vermittelte Transformation (Hiei et al., Plant J. 6 (1994), 271-282; Hiei et al., Plant Mol. Biol. 35 (1997), 205-218; Park et al., J. Plant Biol. 38 (1995),  
30 365-371), die Protoplasten-Transformation (Datta, In "Gene transfer to plants", Potrykus, Spangenberg (Eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1995, 66-75; Datta et al., Plant Mol. Biol. 20 (1992), 619-629; Sadasivam et al., Plant Cell Rep. 13 (1994), 394-396), der biolistische Ansatz zur Pflanzentransformation (Li et al., Plant Cell Rep. 12 (1993), 250-255; Cao et al., Plant Cell Rep. 11 (1992), 586-591;

Christou, Plant Mol. Biol. (1997), 197-203) sowie die Elektroporation (Xu et al., In "Gene transfer to plants", Potrykus, Spangenberg (Eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1995, 201-208).

- 5 Ferner sind Gegenstand der Erfindung Pflanzen, enthaltend die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und/oder die durch Regeneration aus erfindungsgemäßen Pflanzenzellen erzeugt werden können. Bevorzugt handelt es sich um monokotyledone Nutzpflanzen, wie z.B. Roggen, Gerste, Hafer, Weizen, Hirse, Reis, Mais. Bevorzugt sind Weizen, Reis und Mais, besonders bevorzugt ist Weizen.

- 10 Die erfindungsgemäßen Pflanzen synthetisieren eine modifizierte Stärke, die sich, wie im Zusammenhang mit den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen beschrieben, in ihrem Phosphatgehalt und/oder in ihrem Phosphorylierungsmuster und/oder in ihren Viskositätseigenschaften von Stärken aus entsprechenden nicht genetisch  
15 modifizierten Wildtyp-Pflanzen unterscheidet.

- Die Erfindung betrifft daher auch erfindungsgemäße Pflanzen, die eine Stärke synthetisieren, die im Vergleich zu Stärke aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzen einen erhöhten Phosphatgehalt in C6-Position der  
20 Glukosemonomere und/oder ein verändertes Phosphorylierungsmuster und/oder veränderte Viskositätseigenschaften aufweist.

- Hinsichtlich der Erhöhung des Phosphatgehaltes in C6-Position der Glukosemonomere der Stärke, der Veränderung des Phosphorylierungsmusters und der Veränderung der Viskositätseigenschaften der Stärke gelten die im  
25 Zusammenhang mit den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen gemachten Angaben.

- Vorzugsweise betrifft die vorliegende Erfindung erfindungsgemäße Pflanzen, die eine Stärke synthetisieren, die nach Verkleisterung ein Gel bildet, das im Vergleich zu einem Gel aus Stärke von entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-  
30 Pflanzen eine erhöhte Gelfestigkeit aufweist.

Der Begriff "erhöhte Gelfestigkeit" wurde im Zusammenhang mit den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen definiert.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung synthetisieren die erfindungsgemäßen Pflanzen, vorzugsweise Weizenpflanzen, eine Stärke, vorzugsweise Weizenstärke, die in C6-Position der Glukosemonomere einen Phosphatgehalt von von mindestens  $0.1 \text{ nmol C6-P mg}^{-1}$

- 5 Stärke, insbesondere von mindestens  $0.5 \text{ nmol C6-P mg}^{-1}$ , bevorzugt von mindestens  $1 \text{ nmol C6-P mg}^{-1}$  Stärke, besonders bevorzugt von mindestens  $2 \text{ C6-P nmol mg}^{-1}$  Stärke, insbesondere von mindestens  $5 \text{ nmol C6-P mg}^{-1}$  Stärke, ganz besonders bevorzugt von mindestens  $10 \text{ nmol C6-P mg}^{-1}$  Stärke, wobei die erfindungsgemäßen Pflanzen eine Stärke synthetisieren, die in C6-Position der
- 10 Glukosemonomere einen Phosphatgehalt von höchstens  $100 \text{ nmol C6-P mg}^{-1}$  Stärke aufweist, insbesondere von höchstens  $50 \text{ nmol C6-P mg}^{-1}$  Stärke oder von höchstens  $25 \text{ nmol C6-P mg}^{-1}$  Stärke.

- In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung können die die erfindungsgemäßen
- 15 Pflanzen eine Stärke synthetisieren, die in C6-Position der Glukosemonomere einen Phosphatgehalt von mindestens  $15 \text{ C6-P nmol mg}^{-1}$  Stärke aufweist, wobei die erfindungsgemäßen Pflanzen eine Stärke synthetisieren, die in C6-Position der Glukosemonomere einen Phosphatgehalt von höchstens  $100 \text{ nmol C6-P mg}^{-1}$  Stärke aufweist, insbesondere von höchstens  $50 \text{ nmol C6-P mg}^{-1}$  Stärke oder von
- 20 höchstens  $25 \text{ nmol C6-P mg}^{-1}$  Stärke.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung synthetisieren die erfindungsgemäßen Pflanzen die erfindungsgemäße Stärke in den stärke-speichernden Organen der erfindungsgemäßen Pflanze.

- In einer besonders bevorzugten Ausführungsform synthetisieren die erfindungsgemäßen Pflanzen in ihren stärke-speichernden Organen eine Stärke, die im Vergleich zu Stärke aus stärke-speichernden Organen entsprechender nicht genetisch modifizierter Wildtyp-Pflanzen einen erhöhten Phosphatgehalt in C6-
- 30 Position der Glukosemonomere und/oder ein verändertes Phosphorylierungsmuster und/oder veränderte Viskositätseigenschaften aufweist.

Unter "stärke-speichernden Organen" sollen in diesem Zusammenhang solche Organe verstanden werden, wie z.B. die Körner von Mais-, Reis- und

Weizenpflanzen, die Speicherstärke einlagern im Gegensatz zu solchen Organen, wie z.B. Blättern, die Stärke nur transient synthetisieren.

Die Expression des fremden Nucleinsäuremoleküls ist vor allem in  
 5 stärke-speichernden Organen von monokotyledonen Pflanzen von Vorteil,  
 insbesondere von Weizenpflanzen, und führt zu einer Erhöhung des  
 Phosphatgehaltes der aus den stärke-speichernden Organen isolierbaren Stärken im  
 Vergleich zu Stärken, die man aus stärke-speichernden Organen entsprechender  
 nicht genetisch modifizierter Wildtyppflanzen, insbesondere von Weizenpflanzen,  
 10 isolieren kann.

Die Expression des fremden Nucleinsäuremoleküls in stärke-speichernden Organen  
 von monokotyledonen Pflanzen läßt sich zum einen erreichen durch die Verwendung  
 konstitutiver Promotoren, wie z.B. des Promotors der 35S RNA des Cauliflower  
 15 Mosaic Virus (s. beispielsweise US-A-5,352,605) und des Ubiquitin-Promotors aus  
 Mais (s. beispielsweise US-A-5,614,399).

Vorzugsweise werden Promotoren verwendet, die spezifisch sind für  
 stärke-speichernde Organe, wie z.B. endosperm-spezifische Promotoren, wie  
 20 beispielsweise der Glutelin-Promotor (Leisy et al., Plant Mol. Biol. 14, (1990), 41-50;  
 Zheng et al., Plant J. 4, (1993), 357-366; Yoshihara et al., FEBS Lett. 383, (1996),  
 213-218), der Shrunk-1 Promotor (Werr et al., EMBO J. 4, (1985), 1373-1380), der  
 HMW-Promotor aus Weizen (Anderson, Theoretical and Applied Genetics 96,  
 (1998), 568-576, Thomas, Plant Cell 2 (12), (1990), 1171-1180), der USP-Promotor,  
 25 der Phaseolinpromotor (Sengupta-Gopalan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985),  
 3320-3324, Bustos, Plant Cell 1 (9) (1989), 839-853) oder Promotoren von Zein-  
 Genen aus Mais (Pedersen et al., Cell 29, (1982), 1015-1026; Quatroccio et al.,  
 Plant Mol. Biol. 15 (1990), 81-93) oder die karyopsenspezifischen Promotoren der  
 GBSSI (granule bound starch synthase I) (DE10041861.9) und der SSII (soluble  
 30 starch synthase II) aus Weizen (DE10032379.0).

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform zeigen die erfindungsgemäßen  
 Pflanzen in den stärke-speichernden Organen dieser Pflanzen eine R1-  
 Genexpression.

Die R1-Genexpression kann beispielsweise bestimmt werden durch Messung der Menge an R1-Transkripten, z.B. durch Northern-Blot-Analyse, im Vergleich zur Menge an R1-Transkripten von Wildtyppflanzen.

5

Ferner kann die R1-Genexpression im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung durch Messung der Menge an R1-Protein, z.B. durch Western-Blot-Analyse, bestimmt werden. Vorzugsweise erfolgt die Bestimmung der Menge an R1-Protein mit Hilfe von Protein-Extrakten, die aus Pflanzenzellen des Endosperms

10

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung zeigen die erfindungsgemäßen Pflanzen in den stärkespeichernden Organen dieser Pflanzen eine R1-

Genexpression, die im Vergleich zur R1-Genexpression in stärkespeichernden

15

Organen entsprechender nicht genetisch modifizierter Wildtyp-Pflanzen erhöht ist, vorzugsweise um mindestens 50%, besonders bevorzugt um mindestens 100%, insbesondere um mindestens 250% und besonders bevorzugt um mindestens 500%.

20

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform zeigen die erfindungsgemäßen Pflanzen eine organspezifische Expression des fremden Nucleinsäuremoleküls in den stärkespeichernden Organen der erfindungsgemäßen Pflanzen.

25

Unter dem Begriff „organspezifisch“ versteht man im Sinne der vorliegenden Erfindung, daß der gewählte Promoter die Expression des fremden

Nucleinsäuremoleküls in den stärkespeichernden Organen im Vergleich zu reifen Blättern begünstigt und eine signifikant, wie beispielsweise mindestens 2- bis 5-fach, bevorzugt 5- bis 10-fach, besonders bevorzugt 10- bis 100fach erhöhte Expression bewirkt.

30

In dieser Ausführungsform der Erfindung zeichnen sich die erfindungsgemäßen Pflanzen dadurch aus, daß sie aufgrund der organspezifischen Expression des fremden Nucleinsäuremoleküls eine erhöhte R1-Genexpression in den stärkespeichernden Organen aufweisen im Vergleich zur Genexpression des endogenen R1-Gens in den stärkespeichernden Organen einer entsprechenden

nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanze. In dieser Ausführungsform der Erfindung ist eine Erhöhung der R1-Genexpression in den Blättern der erfindungsgemäßen Pflanzen nicht in gleichem Ausmaß wie in den stärkepeichernden Organen nachweisbar. Vorzugsweise bezieht sich die Erhöhung  
 5 der R1-Genexpression alleine auf die stärkepeichernden Organe.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung handelt es sich bei den erfindungsgemäßen Pflanzen um Pflanzen aus der Gruppe bestehend aus Weizen, Reis, Gerste, Hirse, Hafer, Roggen und Mais. Bevorzugt sind Weizen-, Reis- und  
 10 Maispflanzen, besonders bevorzugt Weizenpflanzen.

Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäß definierten Pflanze, worin

- (a) eine Zelle einer monokotyledonen Pflanze genetisch modifiziert wird, wobei  
 15 die genetische Modifikation in der Einführung mindestens eines fremden Nucleinsäuremoleküls besteht;
- (b) aus der gemäß Schritt (a) hergestellten Zelle eine Pflanze regeneriert wird; und gegebenenfalls
- (c) aus der gemäß Schritt (b) erzeugten Pflanze weitere Pflanzen erzeugt  
 20 werden.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäß definierten Pflanze, die in den stärkepeichernden Organen dieser Pflanze eine Stärke mit erhöhtem Phosphatgehalt und/oder einem veränderten Phosphorylierungsmuster und/oder einer erhöhten Endviskosität synthetisiert im Vergleich zu Stärke aus stärkepeichernden Organen von Wildtyp-Pflanzen, worin

- (a) eine Zelle einer monokotyledonen Pflanze genetisch modifiziert wird, wobei  
 die genetische Modifikation in der Einführung mindestens eines  
 erfindungsgemäß definierten fremden Nucleinsäuremoleküls besteht;
- 30 (b) aus der gemäß Schritt (a) hergestellten Zelle eine Pflanze regeneriert wird; und gegebenenfalls
- (c) aus der gemäß Schritt (b) erzeugten Pflanze weitere Pflanzen erzeugt werden.

Für die laut Schritt (a) eingeführte genetische Modifikation gilt dasselbe, was bereits oben in Zusammenhang mit den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und Pflanzen erläutert wurde.

Die Regeneration von Pflanzen gemäß Schritt (b) kann nach dem Fachmann bekannten Methoden erfolgen.

Die Erzeugung weiterer Pflanzen gemäß Schritt (c) der erfindungsgemäßen Verfahren kann z.B. erfolgen durch vegetative Vermehrung (beispielsweise über Stecklinge, Knollen oder über Calluskultur und Regeneration ganzer Pflanzen) oder durch sexuelle Vermehrung. Die sexuelle Vermehrung findet dabei vorzugsweise kontrolliert statt, d.h. es werden ausgewählte Pflanzen mit bestimmten Eigenschaften miteinander gekreuzt und vermehrt.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung zeichnen sich die erfindungsgemäße Verfahren dadurch aus, daß das gemäß Schritt (a) in die Pflanzenzelle eingeführte fremde Nucleinsäuremolekül ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:

- (i) Nucleinsäuremolekülen, die die codierende Region der unter Seq ID No. 1 dargestellten Nucleotidsequenz umfassen;
- (ii) Nucleinsäuremolekülen, die ein R1-Protein aus *Solanum tuberosum* mit der unter Seq ID No. 2 angegebenen Aminosäuresequenz codieren;
- (iii) Nucleinsäuremolekülen, die ein Derivat der unter Seq ID No. 1 angegebenen Nukleotidsequenz darstellen; und
- (iv) Nucleinsäuremolekülen, die Fragmente der unter (i), (ii) oder (iii) genannten Nucleinsäuremoleküle darstellen.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform zeichnen sich die erfindungsgemäßen Verfahren dadurch aus, daß das fremde Nucleinsäuremolekül unter der Kontrolle eines Promotors steht, der organspezifisch die R1-Genexpression in stärkespeichernden Geweben vermittelt, vorzugsweise eines endospermspezifischen und/oder karyopsenspezifischen Promoters.

Derartige Promotoren, wie z.B. endospermspezifische und karyopsenspezifische, wurden oben im Zusammenhang mit den erfindungsgemäßen Pflanzen in beispielhafter Weise aufgeführt.

In einer weiteren Ausführungsform betreffen die erfindungsgemäßen Verfahren monokotyledone Nutzpflanzen, wie z.B. Roggen, Gerste, Hafer, Weizen, Hirse, Reis, Mais. Bevorzugt sind Weizen, Reis und Mais, besonders bevorzugt ist Weizen.

5

Die vorliegende Erfindung betrifft auch die durch die erfindungsgemäßen Verfahren erhältlichen Pflanzen.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch Vermehrungsmaterial erfindungsgemäßer  
10 Pflanzen enthaltend erfindungsgemäße Pflanzenzellen sowie der gemäß den erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Pflanzen. Der Begriff

„Vermehrungsmaterial“ umfaßt im Sinne der vorliegenden Erfindung jene  
Bestandteile der Pflanze, die geeignet sind zur Erzeugung von Nachkommen auf  
vegetativem oder generativem Weg. Für die vegetative Vermehrung eignen sich

15 beispielsweise Stecklinge, Calluskulturen, Rhizome oder Knollen. Anderes Vermehrungsmaterial umfaßt beispielsweise Früchte, Samen, Sämlinge, Protoplasten, Zellkulturen etc.. Vorzugsweise handelt es sich bei dem Vermehrungsmaterial um Samen.

20 Ferner betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von erfindungsgemäß definierten fremden Nucleinsäuremolekülen zur Herstellung von erfindungsgemäßen Pflanzen, vorzugsweise von Weizen-, Mais- und Reispflanzen, besonders bevorzugt von Weizenpflanzen, oder zur Herstellung von monokotyledonen erfindungsgemäßen Pflanzenzellen.

25

Die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisieren, insbesondere in ihren stärkepeichernden Organen, eine Stärke, die in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften, insbesondere dem Phosphatgehalt und/oder dem Viskositätsverhalten und/oder dem Phosphorylierungsmuster im Vergleich zu in  
30 Wildtyp-Pflanzen synthetisierter Stärke und im Vergleich zu chemisch phosphorylierten Stärken verändert ist.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher auch Stärke, die aus den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen, Pflanzen und/oder Vermehrungsmaterial erhältlich ist.

- 5 In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind die erfindungsgemäßen Stärken dadurch gekennzeichnet, daß sie im Vergleich zu Stärke aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyppflanzen einen erhöhten Phosphatgehalt in C6-Position der Glukosemonomere und/oder ein verändertes Phosphorylierungsmuster und/oder eine erhöhte Endviskosität aufweist.

10

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung auch Stärke, die dadurch gekennzeichnet ist, daß sie im Vergleich zu Stärke aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyppflanzen einen erhöhten Phosphatgehalt in C6-Position der Glukosemonomere und/oder ein verändertes Phosphorylierungsmuster und/oder eine erhöhte Endviskosität aufweist.

15

Hinsichtlich der Erhöhung des Phosphatgehaltes in C6-Position, der Veränderung des Phosphorylierungsmusters und der Veränderung der Viskositätseigenschaften (Endviskosität) gelten die im Zusammenhang mit den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen gemachten Angaben.

20

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung Stärken, vorzugsweise Weizenstärken, die dadurch gekennzeichnet sind, daß sie in C6-Position der Glukosemonomere einen Phosphatgehalt von mindestens  $0.1 \text{ nmol C6-P mg}^{-1}$  Stärke, insbesondere von mindestens  $0.5 \text{ nmol C6-P mg}^{-1}$ , bevorzugt von mindestens  $1 \text{ nmol C6-P mg}^{-1}$  Stärke, besonders bevorzugt von mindestens  $2 \text{ C6-P nmol mg}^{-1}$  Stärke, insbesondere von mindestens  $5 \text{ nmol C6-P mg}^{-1}$  Stärke, ganz besonders bevorzugt von mindestens  $10 \text{ nmol C6-P mg}^{-1}$  Stärke und/oder eine erhöhte Endviskosität aufweisen, wobei die erfindungsgemäße Stärke in C6-Position der Glukosemonomere einen Phosphatgehalt von höchstens  $100 \text{ nmol C6-P mg}^{-1}$  Stärke aufweist, insbesondere von höchstens  $50 \text{ nmol C6-P mg}^{-1}$  Stärke oder von höchstens  $25 \text{ nmol C6-P mg}^{-1}$  Stärke.

25

30

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung können die erfindungsgemäßen Stärke dadurch gekennzeichnet sein, daß sie in C6-Position der Glukosemonomere einen Phosphatgehalt von mindestens 15 C6-P nmol mg<sup>-1</sup> Stärke aufweisen, wobei die erfindungsgemäße Stärke in C6-Position der Glukosemonomere einen

- 5 Phosphatgehalt von höchstens 100 nmol C6-P mg<sup>-1</sup> Stärke aufweist, insbesondere von höchstens 50 nmol C6-P mg<sup>-1</sup> Stärke oder von höchstens 25 nmol C6-P mg<sup>-1</sup> Stärke.

- 10 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen Stärken, vorzugsweise Weizenstärken, dadurch gekennzeichnet, daß die erfindungsgemäßen Stärken nach Verkleisterung Gele bilden, die im Vergleich zu Gelen von entsprechenden chemisch phosphorylierten Stärken gleichen Phosphatgehaltes und/oder im Vergleich zu Gelen von Stärken aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzen eine erhöhte Gelfestigkeit aufweisen.

- In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung können die erfindungsgemäßen Stärken dadurch gekennzeichnet sein, daß die Phosphatgruppen zu einem überwiegenden Teil an die Amylopektinkomponente der Stärke gebunden vorliegen, während die Amylose nur einen sehr geringen Gehalt an
- 20 kovalent gebundenen Stärkemonophosphatester aufweist. Im Vergleich zu chemisch phosphorylierten Stärken vergleichbarem C-6- Phosphatgehaltes zeichnen sich die erfindungsgemäßen Stärken der erfindungsgemäßen Pflanzenzellen dadurch aus, daß die Amylose der erfindungsgemäßen Stärken weniger stark phosphoryliert ist.

25

- In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung können die erfindungsgemäßen Stärken dadurch gekennzeichnet sein, daß die Amylosekomponente dieser Stärke im Vergleich zur Amylosekomponente chemisch phosphorylierter Stärke, die vorzugsweise einen gleichen Phosphatgehaltes in C6-Position der
- 30 Glukosemonomere aufweist, einen verringerten Gesamtposphatgehalt in der Amylosekomponente enthält.

Methoden zur Bestimmung des Gesamtposphatgehaltes sind dem Fachmann bekannt und sind unten (s. Methoden) beschrieben.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung kann die erfindungsgemäße Stärke dadurch gekennzeichnet sein, daß der per  $^{31}\text{P}$ -NMR (Kasemsuwan und Jane (Cereal Chemistry 73 (6), (1996), 702-707) nachweisbare Gesamtphosphatgehalt der Amylosekomponente dieser Stärke im Vergleich zur Amylosekomponente von chemisch phosphorylierter Stärke gleichen Phosphatgehaltes in C6-Position der Glukosemonomere, die aus Stärke von entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzen hergestellt wurde, um mindestens 5%, bevorzugt um mindestens 20%, insbesondere um mindestens 50% und besonders bevorzugt um mindestens 80% verringert ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung können die erfindungsgemäßen Stärken dadurch gekennzeichnet sein, daß sie im Vergleich zu chemisch phosphorylierten Stärken ein verändertes Phosphorylierungsmuster aufweisen.

Der Begriff verändertes Phosphorylierungsmuster wurde im Zusammenhang mit den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen bereits definiert.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung handelt es sich um Stärken von monokotyledone Nutzpflanzen, wie z.B. Roggen-, Gerste-, Hafer-, Weizen-, Hirse-, Reis- und Maisstärke. Bevorzugt sind Weizen-, Reis- und Maisstärke, besonders bevorzugt ist Weizenstärke.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Stärke umfassend den Schritt der Extraktion der Stärke aus einer oben beschriebenen erfindungsgemäßen Pflanze(nzelle) und/oder aus stärkepeichernden Teilen einer solchen Pflanze und/oder aus dem erfindungsgemäßen Vermehrungsmaterial. Vorzugsweise umfaßt ein solches Verfahren auch den Schritt des Erntens der kultivierten Pflanzen und/oder stärkepeichernder Teile dieser Pflanzen vor der Extraktion der Stärke und besonders bevorzugt ferner den Schritt der Kultivierung erfindungsgemäßer Pflanzen und/oder des erfindungsgemäßen Vermehrungsmaterials vor dem Ernten. Verfahren zur Extraktion der Stärke von Pflanzen oder von stärkepeichernden Teilen von Pflanzen sind dem Fachmann bekannt. Weiterhin sind Verfahren zur

Extraktion der Stärke aus verschiedenen stärke-speichernden Pflanzen beschrieben, z. B. in "Starch: Chemistry and Technology (Hrsg.: Whistler, BeMiller und Paschall (1994), 2. Ausgabe, Academic Press Inc. London Ltd; ISBN 0-12-746270-8; siehe z. B. Kapitel XII, Seite 412-468: Mais und Sorghum-Stärken: Herstellung; von Watson; 5 Kapitel XIII, Seite 469-479: Tapioca-, Arrowroot- und Sagostärken: Herstellung; von Corbishley und Miller; Kapitel XIV, Seite 479-490: Kartoffelstärke: Herstellung und Verwendungen; von Mitch; Kapitel XV, Seite 491 bis 506: Weizenstärke: Herstellung, Modifizierung und Verwendungen; von Knight und Oson; und Kapitel XVI, Seite 507 bis 528: Reisstärke: Herstellung und Verwendungen; von Rohmer und Klem; 10 Maisstärke: Eckhoff et al., Cereal Chem. 73 (1996) 54-57, die Extraktion von Maisstärke im industriellen Maßstab wird in der Regel durch das sogenannte "wet milling" erreicht). Vorrichtungen, die für gewöhnlich bei Verfahren zur Extraktion von Stärke von Pflanzenmaterial verwendet werden, sind Mühlen, Separatoren, Dekanter, Hydrocyclone, Sprühtrockner und Wirbelschichttrockner.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner erfindungsgemäße Stärke, die durch das oben beschriebene erfindungsgemäße Verfahren erhältlich ist.

Die erfindungsgemäßen Stärken können nach dem Fachmann bekannten Verfahren 20 nachträglich modifiziert werden und eignen sich in unmodifizierter oder modifizierter Form für verschiedene Verwendungen im Nahrungsmittel- oder Nicht-Nahrungsmittelbereich.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch erfindungsgemäß definierte Stärken, 25 die nachträglich chemisch und/oder physikalisch modifiziert worden sind.

Verschiedene Möglichkeiten zur chemischen/physikalischen Modifizierung werden weiter unten beschrieben.

Die Erzeugung modifizierter Stärken mittels gentechnischer Eingriffe in einer Pflanze 30 kann zum einen die Eigenschaften der aus der Pflanze gewonnenen Stärke dahingehend verändern, daß weitere Modifikationen mittels chemischer oder physikalischer Verfahren nicht mehr notwendig erscheinen. Zum anderen können die durch gentechnische Verfahren veränderte Stärken weiteren chemischen und/oder physikalischen Modifikationen unterworfen werden, was zu weiteren

Verbesserungen der Qualität für bestimmte der oben beschriebenen Einsatzgebiete führt. Diese chemischen und physikalischen Modifikationen sind grundsätzlich bekannt. Insbesondere handelt es sich dabei um Modifikationen durch:

- Hitzebehandlung,
- Säurebehandlung,
- Erzeugung von Stärkeethern
  - Stärke-Alkylether, O-Allylether, Hydroxylalkylether,
  - O-Carboxylmethylether, N-haltige Stärkeether, P-haltige
  - Stärkeether, S-haltige Stärkeether
- Erzeugung von vernetzten Stärken
- Erzeugung von Stärke-Pfropf-Polymerisaten
- Oxidation und
- Veresterungen, welche zur Entstehung von Phosphat-, Nitrat-, Sulfat-, Xanthat-, Acetat- und Citratstärken führen. Weitere organische Säuren können ebenfalls zur Veresterung eingesetzt werden.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegenden Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäßen Stärken im industriellen Bereich, vorzugsweise zur Herstellung von Lebensmitteln.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung Weizenmehl, das die erfindungsgemäßen Stärken enthält. Das erfindungsgemäße Weizenmehl zeichnet sich u.a. durch veränderte Backeigenschaften im Vergleich zu herkömmlichen Weizenmehlen aus. Verfahren zur Herstellung von Weizenmehl aus Weizenkörnern sind dem Fachmann bekannt. Das erfindungsgemäße Weizenmehl kann mittels dieser Verfahren aus den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und Pflanzen sowie aus dem erfindungsgemäßen Vermehrungsmaterial isoliert werden.

Die Figuren zeigen:

Figur 1: Schematische Darstellung eines RVA-Profiles

Figur 2: Plasmidkarte des Vektors pUbi2afp

Figur 3: Plasmidkarte des Vektors pUbiR1

Figur 4: Plasmidkarte des Vektors p35SAcS (Derivat von pUC18 (Pietrzak M. et al., Nucleic Acids Res. 14, (1986), 5857-5868): enthält das pat-Gen aus

*Streptomyces viridochromogenes* (Wohlleben et al., Gene 70, (1988), 25-37) unter der Kontrolle des CaMV35S Promotors.

Figur 5: Plasmidkarte des Vektors pAct1-Fneo/Calgus (pUC19-Derivat (Yannish-Perron et al., 1985, Gene 33: 103-119): entstanden aus pAct1-Fneo (Müller et al., Plant Science 114, (1996), 71-82) und pCalgus, das den CaMV35S Promotor (s. beispielsweise US-A-5,352,605), das Adhl Intron aus Mais und das beta-Glucuronidase (GUS)-Gens (The GUS Reporter System as a Tool to Study Plant Gene Expression in: GUS Protocols: Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression, Academic Press (1992), 23-43) enthält.

#### Methoden:

Bestimmung des Phosphatgehaltes in C6-Position der Glukosemonomere (= C6-P-Gehalt) der Stärke (Nielsen et al. Plant Physiol. 105, (1994), 111-117):

Zur Bestimmung des C6-P-Gehaltes der Stärke werden 50 mg Stärke in 500 µl 0,7 M HCl 4 h bei 95°C hydrolysiert. Anschließend werden die Ansätze für 10 min bei 15500 g zentrifugiert und die Überstände abgenommen. Von den Überständen werden 7 µl mit 193 µl Imidazol-Puffer (100 mM Imidazol, pH 7,4; 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA und 0,4 mM NAD) gemischt. Die Messung wurde im Photometer bei 340 nm durchgeführt. Nach der Etablierung einer Basisabsorption wurde die Enzymreaktion durch die Zugabe von 2u Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase (von Leuconostoc mesenteroides, Boehringer Mannheim) gestartet. Die Absorptionsänderung ist direkt proportional zur Konzentration des G-6-P Gehaltes der Stärke.

Bestimmung des Gesamtposphatgehaltes der Stärke:

Vor Bestimmung des Gesamtposphatgehaltes der Stärke muß die Stärke vollständig getrennt werden von phosphorylierten Nicht-Glukanen, wie z.B. Phospholipiden.

Die Bestimmung des Gesamtposphatgehaltes kann nach der Methode von Ames (Methods in Enzymology VIII, (1966), 115-118) folgendermaßen bestimmt werden: Es werden ca. 50 mg Stärke mit 30 µl 10%iger ethanolischer Magnesiumnitrat-Lösung versetzt und drei Stunden bei 500°C im Muffelofen verascht. Der Rückstand wird mit 500 µl 0,5 M Salzsäure versetzt und 30 min bei 60°C inkubiert.

Anschließend wird ein 20 µl Aliquot auf 300 µl 0,5 M Salzsäure aufgefüllt, zu einer Mischung aus 100 µl 10%iger Ascorbinsäure und 600 µl 0,42% Ammoniummolybdat in 1 M Schwefelsäure gegeben und 20 min bei 45°C inkubiert. Es folgt eine photometrische Bestimmung bei 820nm unter Berücksichtigung einer Phosphat-

5 Eichreihe als Standard.

#### Bestimmung der Gelfestigkeit (Texture Analyzer)

2.5 g Stärke (TS) werden in 25 ml H<sub>2</sub>O im RVA-Gerät verkleistert (s. Bestimmung der Viskositätseigenschaften mittels eines Rapid Visco Analyzers (RVA)) und

10 anschließend für 24 h bei Raumtemperatur gelagert. Die Proben werden unter der Sonde (zylindrischer Stempel mit planer Oberfläche) eines Texture Analysers TA-XT2 der Firma Stable Micro Systems (Surrey, UK) fixiert und die Gelfestigkeit unter folgenden Geräteeinstellungen bestimmt:

|    |   |                      |                     |
|----|---|----------------------|---------------------|
|    | - | Test-Geschwindigkeit | 0,5 mm/s            |
| 15 | - | Eindringtiefe        | 7 mm                |
|    | - | Kontaktfläche        | 113 mm <sup>2</sup> |
|    | - | Druck                | 2g                  |

#### Bestimmung der Viskositätseigenschaften (z.B. Endviskosität) mittels eines Rapid Visco Analyzers (RVA)

2.5 g Stärke (Trockengewicht) werden in 25 ml H<sub>2</sub>O aufgenommen und für die Analyse in einem Rapid Visco Analyser (Newport Scientific Pty Ltd., Investmet Support Group, Warriewood NSW 2102, Australien) verwendet. Der Betrieb des

Gerätes erfolgt nach den Angaben des Herstellers. Zur Bestimmung der Viskosität der wässrigen Lösung der Stärke wird die Stärkesuspension zunächst für eine Minute auf eine Temperatur von 50°C gebracht und anschließen von 50°C auf 95°C erhitzt, mit einer Geschwindigkeit von 12°C pro Minute. Anschließend wird die Temperatur für 2,5 Min bei 95°C gehalten. Danach wird die Lösung von 95°C auf 50°C abgekühlt, mit einer Geschwindigkeit von 12°C pro Minute. Abschließend wird die

25

30 Temperatur für weitere 6 Minuten bei 50°C gehalten. Während der gesamten Dauer wird die Viskosität bestimmt.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung ohne sie in irgendeiner Hinsicht zu beschränken:

#### Beispiel 1

5

#### Herstellung des Vektors pUbiR1 zur Transformation von Weizenpflanzen

Zur Herstellung des Vektors pUbiR1 wurde zunächst der Vektor pUbi.cas folgendermaßen hergestellt:

- 10 Der Vektor pUbi2afp (s. Figur 2) wurde partiell mit den Restriktionsenzymen PstI/EcoRI geschnitten. Das daraus resultierende 4,19 Kb- Fragment, bestehend aus dem pUC19 Vektor (Yannish-Perron et al., 1985, Gene 33: 103-119), dem 1,5 Kb großen Ubiquitin- Promotor sowie dem ersten Exon des ubi-Gens und einem verkürzten Ubiquitin1-Intron (Clal-Deletion) (Christensen et al., Plant Mol. Biol. 18, 15 (1992), 675-689) wurde nach Gelelution weiter verwendet.

Aus dem Vektor pAct.cas (Produktnummer Cambia TG0063 der Firma Cambia, GPO Box 3200, Canberra ACT 2601, Australien) wurde der nos-Terminator als PstI/EcoRI Fragment isoliert und eine Ligation der beiden Fragmente zum Vektor pUbi.cas durchgeführt.

- 20 Anschließend wurde die cDNA des Kartoffel-R1-Gens (SEQ ID No.1) als partieller Verdau (SmaI/Asp718-Fragment) aus dem Vektor pRL2 (WO97/11188, Beispiel 4, hinterlegt bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen unter der Nummer DSM 10225) isoliert und in den Vektor pUbi.cas (Restriktion mit SmaI/Asp718) integriert.

- Das resultierende Konstrukt wurde als pUbiR1 (s. Figur 3) bezeichnet. Dieses 25 Konstrukt umfaßt die codierende Region der R1 cDNA aus Kartoffel, die unter Kontrolle des Ubiquitinpromoters (Christensen et al., 1992, Plant Mol. Biol. 18: 675-689) steht, sowie als zusätzliche Regulationseinheiten das 1. Exon des ubi-Gens (Christensen et al., Plant Mol. Biol. 18, (1992), 675-689) und das verkürzte 1. Intron (Christensen et al., Plant Mol. Biol. 18, (1992), 675-689), wobei das interne Clal-

- 30 Fragment deletiert ist).

## Beispiel 2

Herstellung von Weizenpflanzen, die ein R1-Gen aus *Solanum tuberosum* exprimieren, und Analyse des Phosphatgehaltes der Stärken dieser Pflanzen

5

Zur Weizen-Transformation wurde die biolistische Transformationsmethode verwendet (Becker et al., Plant J. 5 (2), (1994), 229-307). Der Vektor pUbiR1 und zur biolistischen Kotransformation die Vektoren p35SAcS (s. Fig. 4) bzw. pAct1-Fneo/Calgus (Müller et al., Plant Science 114, (1996), 71-82, s. Fig. 5) wurden in gleichen molaren Verhältnissen im DNA-Partikel Fällungsansatz eingesetzt.

10

Der Vektor p35SAcS wurde folgendermaßen hergestellt: Das *pat*-Gen aus *S. viridochromogenes* (Wohlleben et al., Gene 70, (1988), 25-37) wurde über eine Polymerasekettenreaktion amplifiziert. Die eingesetzten Primer wurden so konzipiert, daß an beiden Seiten des Amplifikates eine *Bam*HI-Schnittstelle geschaffen wurde.

15

Das *Bam*HI-Fragment wurde im Anschluß in die zwischen den 35S-Promotor und den 35S-Terminator des Vektors pDH51 (Pietzrak et al., Nucleic Acids Res. 14, (1986), 5857-5868) gelegenen *Bam*HI-Schnittstelle kloniert. Die Kassette, enthaltend den 35S-Promotor, das *pat*-Gen und den 35S-Terminator, wurde als *Eco*RI-Fragment ausgeschnitten und in die *Eco*RI-Schnittstelle des Vektors pUC18

20

(Pietzrak et al., Nucleic Acids Res. 14, (1986), 5857-5868) kloniert.

Als Zielzellen zur Transformation wurden Skutelli 14 Tage alter unreifer Embryonen von Weizenpflanzen verwendet. Nach der Transformation erfolgte die *in vitro* Kultur auf MS<sup>-</sup> Medium (PCT/EP97/02793) enthaltend 2 mg/l 2,4-D (=2,4-Dichlorophenoxy-

●

Essigsäure). Zwei Wochen nach der Transformation erfolgte die Subkultur auf dem

25

gleichen Medium, dem zusätzlich 2 mg/l Phosphinotricin bzw. 150 mg/l Kanamycinsulfat zugesetzt wurde. Nach weiteren zwei Wochen wurden die sich entwickelnden Kalli auf Regenerationsmedium (MS<sup>-</sup>Medium mit 0,1 mg/l 2,4-D und 2 mg/l PPT bzw. 150 mg/l Kanamycin) umgesetzt. Entwickelnde Sprosse wurden auf halbkonzentriertes MS<sup>-</sup> Medium ohne 2,4-D und Phosphinotricin bzw. Kanamycin transferiert und anschließend in Erde überführt. Etwa 14 Tage nach der Etablierung in Erde erfolgte eine Identifizierung transgener Pflanzen durch zweimaliges Besprühen mit einer wässrigen Lösung mit 150 und 200 mg/l Phosphinotricin 0,1% Tween 20 (ICI America, entspricht Polysorbat 20) bzw. durch zweimaliges Besprühen mit 2,5% Kanamycinsulfat, 0,1% Tween 20.

30

### Expression des Kartoffel-R1 Gens in T<sub>0</sub>-Pflanzen

Die Expression des Kartoffel-R1 Gens in transgenen Weizen T<sub>0</sub>-Pflanzen wurde durch Northern- und Western-Blot Analysen und durch die enzymatische

- 5 Bestimmung des Phosphatgehaltes in C6-Position der Glukosemonomere der Stärke aus Karyopsen (Nielsen et al., Plant Physiol. 105, (1994), 111-117) nachgewiesen. R1-Protein wurde mit Hilfe eines Antikörpers gegen das Kartoffel-R1 Protein (Ritte et al., Plant J. 21(4), (2000), 387-391) in transgenen Weizenpflanzen detektiert. Zum Screenen der transgenen Pflanzen wurden Proteinextrakte aus dem
- 10 Endosperm unreifer, ca. 20 Tage alter Karyopsen, verwendet.

- Zur C6-Phosphatbestimmung wurde Stärke transgener T<sub>0</sub>-Pflanzen aus unreifen und reifen Weizenkaryopsen isoliert. Die Karyopsen wurden im Mörser zu Pulver zerrieben. Nach Zugabe von 15 ml 100 mM Tris-Puffer, pH 8,0 wurde die
- 15 Suspension durch ein 100 µm Sieb filtriert und die Stärke durch Zentrifugation (2600 g, 5 min, 4°C) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Stärkepellet wurde anschließend in 2 ml 100 mM Tris-Puffer, pH 8,0 resuspendiert und auf eine 8 ml Percollgradienten überführt. Durch 15 min. Zentrifugation bei 170 g, 4°C pelletierte die Stärke. Das Stärkepellet wurde anschließend dreimal mit 10 ml 100 Tris-Puffer,
- 20 pH 8,0 gewaschen. Abschließend wurde die Stärke durch eine Aceton-Inkubation entfettet und getrocknet.

- Die Bestimmung des C6-P-Gehaltes erfolgte über eine Glukose-6-phosphat-Bestimmung mittels eines optisch-enzymatischen Tests (Nielsen et al., Plant Physiol. 105, (1994), 111-117) in der oben beschriebenen Weise.
- 25

- Die Untersuchungen zeigten, daß von den in Southern Blot Analysen positiven Weizen-T<sub>0</sub> Pflanzen etwa 50% der Linien in den Karyopsen eine Stärke synthetisierten, die einen erhöhten Phosphatgehalt in C6-Position der Glukosemonomere im Vergleich zu Stärke aus entsprechenden nicht genetisch
- 30 modifizierten Wildtyp-Pflanzen der Varietät Florida aufwies. Tabelle 1 zeigt die Daten für einige ausgewählte Linien.

### Analyse der selbststeten Nachkommen

Saatgut, das durch Selbstung R1-exprimierender Parentallinien erhalten wurde, wurde ausgesät und die Segregationsverhältnisse ermittelt. Durch Southern- und Northern-Blot Analysen konnte sowohl die Integration als auch die Expression des R1-Gens in den T<sub>1</sub>-Nachkommen verschiedener Linien nachgewiesen werden. Von diesen Linien wurde der Gehalt an Phosphat in C6-Position der Stärke ermittelt. Tabelle 1 zeigt die Daten für einige ausgewählte Linien.

Tabelle 1:

| Linie Nr.                | C6P in<br>nmol/mg | Gene-<br>ration | Standard-<br>abweichung |
|--------------------------|-------------------|-----------------|-------------------------|
| Wildtyp Varietät Florida | Not<br>detectable | -               | 0.0                     |
| 19                       | 2.8               | T0              | 0.2                     |
| 20-25                    | 6.7               | T1              | 0.2                     |
| 37                       | 1.4               | T0              | 0.3                     |
| 40A-11-8                 | 10.7              | T2              | 0.7                     |

## Beispiel 3

RVA-Analyse der Stärke von Pflanzen transgener Weizenpflanzen, die ein R1-Gen aus *Solanum tuberosum* exprimieren, sowie Untersuchungen zur Gelfestigkeit

Die Stärken der in den Beispielen 1 und 2 beschriebenen Weizenpflanzen wurden einer RVA-Analyse unterworfen.

Die Ergebnisse der RVA-Analyse (Durchführung: s. Methoden) zeigten, daß das Viskositätsverhalten der Stärken der transgenen Weizenpflanzen, die ein R1-Gen aus *Solanum tuberosum* exprimieren im Vergleich zu Stärken aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Weizenpflanzen (Varietät Florida) deutlich verändert ist (s. Tabelle 2).

Tabelle 2:

| Linie Nr.         | 38    |       |       |       |     |
|-------------------|-------|-------|-------|-------|-----|
|                   | RVA   | RVA   | RVA   | RVA   | RVA |
|                   | Max   | Min   | Fin   | Set   | T   |
|                   | (%)   | (%)   | (%)   | (%)   | (%) |
| Wildtyp (Florida) | 100   | 100   | 100   | 100   | 100 |
| 19 (T0)           | 98.7  | 113.8 | 116.8 | 120.7 | 102 |
| 20-25 (T1)        | 155.3 | 190   | 193.8 | 198.8 | 99  |
| 37 (T0)           | 143.8 | 156.2 | 148.8 | 139   | 101 |
| 40-11-8 (T2)      | 156.2 | 185.5 | 187.7 | 190.6 | 97  |

Legende:

RVA = Rapid Visco Analyzer

Max = s. Figur 1

Min = s. Figur 1

Fin = Endviskosität, s. Figur 1

Set = Setback = Differenz aus Min und Fin, s. Figur 1

T = Verkleisterungstemperatur, s. Figur 1

Die Prozentwerte sind auf den Wildtyp (= 100 %) bezogen.

10 Auch die Gelfestigkeiten der Stärken (Bestimmung der Gelfestigkeit: s. Methoden) der transgenen Weizenpflanzen, die ein R1-Gen aus *Solanum tuberosum* exprimieren, unterscheiden sich sowohl von Stärken aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Weizenpflanzen (Varietät Florida) als auch von Wildtyp-Stärken (Varietät Florida), die nachträglich chemisch phosphoryliert wurden (s. Tabelle 3).

15 Im Gegensatz zu den chemisch phosphorylierten Stärken vergleichbaren Phosphatgehaltes in C6-Position der Glukosemonomere zeigen die Gele der erfindungsgemäßen Stärken nach Verkleisterung eine erhöhte Gelfestigkeit im Vergleich zu Gelen von Stärken von Wildtyp-Pflanzen. Im Gegensatz dazu weisen 20 die chemisch phosphorylierten Stärken, die nach der bei Lim und Seib (Cereal Chem. 70 (2), (1993), 137-144) beschriebenen Methode hergestellt wurden, eine verringerte Gelfestigkeit auf im Vergleich zu Gelen von Stärken von Wildtyp-Pflanzen.

25 Tabelle 3:

| Linie Nr.         | 39<br>Gelfestigkeit<br>(TA)<br>(%) | Phosphatgehalt in C6-<br>Position in $\mu\text{mol}$ Phosphat/g<br>Stärke |
|-------------------|------------------------------------|---|
| Wildtyp (Florida) | 100                                | Nicht detektierbar  |
| 19 (T0)           | 167                                | 2.8   |
| 20-25 (T1)        | 192                                | 6.7   |
| 37 (T0)           | 168                                | 1.4   |
| 40-11-8 (T2)      | 224                                | 10.7  |

Chemisch phosphorylierte  
Wildtyp-(Florida)-Stärke

|       |    |      |
|-------|----|------|
| STMP1 | 84 | 2.1  |
| STMP6 | 75 | 6.5  |
| STMP8 | 67 | 11.5 |

TA = Texture Analyzer

Die Prozentwerte sind auf den Wildtyp (= 100 %) bezogen.

## 5 Sequenzprotokoll:

SEQ ID No. 1 (R1 cDNA Kartoffel, Nucleotid-Sequenz 5061 bp, codierende Region:  
bp 216 bis bp 4607):

```

gaattgtaatacgactcactatagggcgaattgggtaccgggccccccctcgaggtcgacgggtatcgataagcttgat
atcgaattcgcgccgcttttgcttcgtgaattcatcttcacgaatttctcgacgcttctcgctaatttctcggtacttacta
gaaatcgacgtttctagctgaactgagtgaaatagccagtgaggatagagtaattccttagggaataacttgctg
taccagggattcctaacctcaacagtggtggaacataaaagtagaatcagtcctcctgtgtggaggcaattcttgtttc
aacaacaagtgatctcgaaatcaccttatcaactgagttcgaggtaacagggttaaagggtgcagaaaaagaaaata
15 cctatgggaaagaaccgtgcttttctagttctcctcatgctgtacttaccactgatacctcttctgagctagcagaaaagtt
cagtcctagaaggggaattaggctacagggtgatgttaggcctccacttcagggtgatgtgtccttctgtgattttcaagct
acaaatggtagtgataaactgttttgcaactggggggcagtaaagttcggaaaagaaacatgggtctcttctaatgatc
gtccagatgggaccaaagtgacaagaacaaagcacttagaactccattgttaaatctggctctaactccatcctgag
actggagatacgggacactgctatcgaagctattgagtttctatatacgaatgaagcctacgataaatggataaagaa
20 taatgggtggcaatttctgtgtcaaattgtcaagaaaagagatacagggccagatgttctcagttcctgaggagctgtac

```

agatccaatcatatttgagggtgggagaggaagggaaaacagaattacacccctgagaaagagaaggaggaatat  
gaggctgctcgaactgagctacaggaggaaatagctcggtggtccatacaggacattcgagcaaggctaaca  
aaactaatgataaaagtcaaagcaaagaagagcctctcatgtaacaaagagtgaatacctgatgaccttgccca  
agcacaagcttacattaggtgggagaaagcaggaaagccgaactatcctccagaaaagcaaattgaagaactcg  
5 aagaagcaagaagagaattgcaactgagctgagaaaggcattacccttgatgagttgcggaaaaagattacaaa  
aggggagataaaaaactaaggcggaaaagcacgtgaaaagaagctctttgccgtgaaagaatccaaagaaaga  
agagagactttgggcagcttattaataagtatcctccagtcctgcagtacaagtacaaaaggcttggagaaccac  
cagccttatctaaaattaagctgtatgccaaggagaaggaggagcagattgatgatccgatccttaataaaaagatct  
ttaaggctgatgaggggagctactggtactggtagcaaagtcctctgggaagacaaaagtacatatagctacagat  
10 ctgaatcagccaattactcttactgggcattatccaaaagtcgtggagagtggatggtaccaccttcaagcatattgcc  
tcttgatcaattatttagacaaggctgccgaaacaccttttccgccagttcttctgatggtctaacttcaaggtaaat  
ctttggatatagtaattgaagatggcaattttggtgggagtcattttgttctgttctggtgaaaaatggattaagaaccaa  
gggtcggatttctatgttgacttcagtgctgcaccaaattagcactcaaggctgctggggatggcagtggaactgcaa  
agtccttactggataaaaatagcagatatggaaagtgaggctcagaagtcattatgcaccggttaatatgtctgctgact  
15 tgatagaagatgccactagtgctggtgaacttggtttactggaattcttctgatggatgaggtcatggctacaaggcaac  
tgatatggaacaaaaactataacgtaaaaccacgtgaaataagcaaggctcaggacagacttacagacttggtgca  
gaatgctttcaccagtcacccctaataccgtgaaattttgcggatgattatgtcaactgttgagctggagggtgaagggg  
atgtaggacagcgaattagggtatgaaattttggtcatccagaggaaaaatgactgcaaggggtggtatgatggaaga  
atggcatcagaaattgcataataatactagtcctgatgatgtgtgatctgtcaggcattgattgactacatcaagagtga  
20 tttgatcttggtgtttattggaaaaccctgaatgagaacggaataacaaaagagcgtctttgagttatgaccgtgctatc  
cattctgaaccgaatttttagaggagatcaaaagaatggtcttttgcgtgatttaggtcactatatgagaacattgaaggct  
gttcattcagggtgcagatcttgagctgctattgcaaactgcatgggctacaaaactgaggggagaaggcttatggttgg  
agtcagataaatcctgtatcaggcttgccatctggcttcagggcctcctcattttgtcttagaccatgtggaagataaa  
aatgtggaaactcttctgagggattgctagaggctcgtgaggagcttaggcccttgcttctcaaaccacaaacacccgtc  
25 aaaggatctgctgtttttggacatagcacttgattctacagttagaacagcagtagaaaggggatatgaagaattgaac  
aacgctaactcctgagaaaatcatgtactcatctccctcgttcttgaaaatctcgactctctgtggacgataatgaagat  
ctgtttattgcttgaagggatggaatcaagctctttcaatgtccaatggtggagacaaccattgggctttatttgaaaag  
ctgtacttgacagaatccgtcttgcaactgcaagcaaggcagagtgttaccatcacttattgcagccatctgccgaatat  
ctaggatcaatccttgggggtggaccaatgggctttgaacatatttactgaagaaattatacgtgctggatcagcagcttc  
30 attatcctctcttcttaatagactcgatcccgtgcttcggaaaactgcaaatctaggaagttggcagattatcagtcagtt  
gaagccgttgatattgttgcgttggtgagtggttgcattcagttcagaatgaaatctacaagaagcccacgatcttagta  
gcaaaactctgttaaaggagaggaggaaattcctgatggtgctgttgcctgataacaccagacatgccagatgttcttt  
cacatgtttctgttcgagctagaaatgggaagggttgccttgctacatgcttgatcccaatatattggctgacctccaagc  
aaaggaaggaaggattttgctcttaaagcctacaccttcagacataatctatagttaggtgaatgagattgagctcca

aagttcaagtaacttggtagaagctgaaacttcagcaacacttagattggtgaaaaagcaatttggtggtgttacgca  
 atatcagcagatgaattcacaagtgaatggttgagctaaatcacgtaatttgcatactgaaaggaaaagtcctt  
 cctcgggtggaattcctacgtcagtagctcttcatttgagagctttgagaaagtaacttcagacgacataaatcagga  
 gtggcaaaagagttgcaaattctgacgaaaaaactatctgaaggagacttcagcgctcttggtgaaattcgacacaac  
 5 gatthagatctttcagcaccagctcaattggtcaaagagctgaaggaaaagatgcaggggttctggcatgccttggcct  
 ggtgatgaagggtccaaagcgggtgggaacaagcatggatggccataaaaaaggtgtgggcttcaaaatggaatgag  
 agagcatacttcagcacaaggaaggtgaaactggatcatgactatctgtgcatggctgtccttgttcaagaaataataa  
 atgctgattatgcattgtcattcacacaaccaacccatcttccggagacgactcagaaatatatgccgaggtggtcag  
 gggccttggggaaacactgttgagcttaccaggacgtgctttgagttttatctgcaagaaaaaggatctcaactctc  
 10 ctcaagtgttaggttacccaagcaaaccgatcggcctttcataaaaagatctatcatcttccgatctgattccaatggg  
 aagatttgaagggttatgccgggtgctggcctctacgacagtgtaggaatggatgaggaggaaaaaggtgtaattgatta  
 ctcttccgacccattgataactgatggtaactccgccagacaatcctgtccaacattgctcgtgctggacatgctatcga  
 ggagctatatggctctcctcaagacatcgaggggtgtagtgaggatggaaagatttatgtcgttcagacaagacctca  
 gatgtgatcatattctcgttgatgttggtcagagaagaccatagatgtgatcatattctcatggtatcagatctgtgaccact  
 15 tacctcccatgaagttgctgtatgattatacgtgatccaaagccatcacatcatgttcaccttcagctattggaggagaa  
 gtgagaagtaggaattgcaatatgaggaataataagaaaaactttgtagaagttaaattagctgggtatgatatagg  
 agaaatgtgtaaaccattgtactatatatagtatcacacgcattatgtattgcattatgcactgaataatatcgacgcatc  
 aaagaagaaatccttgagtgggttcaattgccgcgccgcgaattcctgcagcccgggggatccactagtcttagag  
 cggccgccaccgcggtggagctccagctttgttcccttagtgagggttaattt  
 20

SEQ ID No.2 (R1-Protein aus Kartoffel, Aminosäuresequenz: 1464 Aminosäuren)

25 MnsnlgnnllyqgflstvlhksrisppcvvggnslfqqqvsksplstefrgrnrkvqkkkipMgknrafssssphavlttdt  
 sselaekfslegnielqvdrpptsdvsfvdqatngsdklflhwgavkfkgketwslpndrpdgtkvyknkalrtpfvk  
 sgsnsilrleirdtaieaiefliydeaydkwiknnggnfrvklrkeirgpdvsvpeelvqiqsylrwerkkgkqnytpেকে  
 eeyeaartelqeeiargasiqdirarttkndksqskeeplhvtkseipddlaqaqayirwekagkpnyypekqieele  
 earrelqlelekgitldelrkkitkgeiktkaekhvkrssfaveriqrkkrdfgqlinkypsspavqvkvleppalskikly  
 30 akekeeqidpilkfivddgellvlvakssgktkvhiatdlnqpitlhwalssrgewMvppssilppgsiildkaae  
 tpfsasssdgltskvqsldiviedgnfvvgMpfvllsgekwiknqgsdfyvdfsaasklalkaagdgshtaksildkiadM  
 eseaqksfMhrfniaadliedatsagelgftgilvwMrfMatrqliwnknynvkpreiskaqdrldllqnaftshpqqrei  
 lrMiMstvggggedvgqrirdeilviqrkndckggMMeewhqklhnntspddvvicqalidyiksdldlgywktln  
 engitkerllsydraihsepnfrgdqkngllrdlghyMrtlkavhsgadlesaiancMgyktegegfmvgvqinpvsgl

psgfgqllhfvl dhvedknvetlleglleareelrplllkpnndkdllfldialdstvrtavergyeelnnanpekiMyfislvl  
nlalsvddnedlvyclkgwnqalsMsnggdnhwalfakavldriralaskaewyhhllqpsaeylgsilgvdqwalni  
fteeiiragsaaslsllnrldpvlrktanlgswqiispveavgvvdellsvqneykkptilvansvkgeeeipdgav  
alitpdMpdvlshvsrarngrkvfatcfdpnildlqakegrillkptpsdiiysevneielqsssnlveaetsatlrivkk  
5 qfggcyaaisadeftseMvgaksrniaylkgkvpssvgiptsvalpfgvfevl sddinqgvakelqiltkklssegdfsalg  
eirttildsapaqlvkelkekMqgsgMpwpqdegpkeweawMaikkwwaskwnerayfstrkvkldhdylcMa  
vlvqeiinadyafvihttnpssgddseiyaevvrglgetlvgaypgralsfickkkdlnspqvlgyppskpiglfikrsiifrsd  
sngedlegayagaglydsvpMdeeeekvvidyssdpltdgnfrqtilsniaraghaieelygspqdiegvvrdgkiyvq  
trpqM

## Patentansprüche

1. Monokotyledone genetisch modifizierte Pflanzenzelle, wobei die genetische Modifikation in der Einführung mindestens eines fremden Nucleinsäuremoleküls besteht und das fremde Nucleinsäuremolekül ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:
- 5
- a) Nucleinsäuremolekülen, die die codierende Region der unter Seq ID No. 1 dargestellten Nucleotidsequenz umfassen;
  - b) Nucleinsäuremolekülen, die ein R1-Protein aus *Solanum tuberosum* mit der unter Seq ID No. 2 angegebenen Aminosäuresequenz codieren;
  - 10 c) Nucleinsäuremolekülen, die ein Derivat der unter Seq ID No. 1 angegebenen Nukleotidsequenz darstellen; und
  - d) Nucleinsäuremolekülen, die Fragmente der unter (a), (b) oder (c) genannten Nucleinsäuremoleküle darstellen.
- 15
2. Pflanzenzelle nach Anspruch 1, die eine erhöhte biologische Aktivität von R1-Protein im Vergleich zu einer entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzelle aufweist.
- 20
3. Pflanzenzelle nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 oder 2, die eine Stärke synthetisiert, die im Vergleich zu Stärke aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen einen erhöhten Phosphatgehalt in C6-Position der Glukosemonomere aufweist.
- 25
4. Pflanzenzelle nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, die eine Stärke synthetisiert, die im Vergleich zu Stärke aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen eine erhöhte Endviskosität aufweist.
- 30
5. Pflanzenzelle nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4, die eine Stärke synthetisiert, die nach Verkleisterung ein Gel bildet, das im Vergleich zu einem Gel aus Stärke von entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen eine erhöhte Gelfestigkeit aufweist.

6. Pflanzenzelle nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5, die aus einer Pflanze der Gruppe bestehend aus Weizen, Reis, Gerste, Hafer, Hirse, Roggen und Mais stammt.
- 5 7. Pflanzenzelle nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5, die aus einer Weizenpflanze stammt.
8. Pflanzenzelle nach Anspruch 7, die eine Stärke synthetisiert, die in C6-Position der Glukosemonomere einen Phosphatgehalt von mindestens 0.1 nmol C6-P  $\text{mg}^{-1}$  Stärke aufweist.
- 10 9. Verfahren zur Herstellung einer Pflanzenzelle nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 8, worin eine Zelle einer monokotyledonen Pflanze genetisch modifiziert wird, wobei die genetische Modifikation in der Einführung mindestens eines fremden Nucleinsäuremoleküls besteht.
- 15 10. Pflanze enthaltend Pflanzenzellen nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 8.
- 20 11. Pflanze nach Anspruch 10, die in ihren stärkepeichernden Organen eine Stärke synthetisiert, die im Vergleich zu Stärke aus stärkepeichernden Organen entsprechender nicht genetisch modifizierter Wildtyp-Pflanzen einen erhöhten Phosphatgehalt in C6-Position der Glukosemonomere aufweist.
- 25 12. Pflanze nach einem oder mehreren der Ansprüche 10 bis 11, die eine Reis-, Weizen- oder Maispflanze ist.
13. Verfahren zur Herstellung einer Pflanze nach einem oder mehreren der Ansprüche 10 bis 12, worin
  - 30 (a) eine Zelle einer monokotyledonen Pflanze genetisch modifiziert wird, wobei die genetische Modifikation in der Einführung mindestens eines fremden Nucleinsäuremoleküls besteht;
  - (b) aus der gemäß Schritt (a) hergestellten Zelle eine Pflanze regeneriert wird; und gegebenenfalls

(c) aus der gemäß Schritt (b) erzeugten Pflanze weitere Pflanzen erzeugt werden.

14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei das fremde Nucleinsäuremolekül unter der Kontrolle eines Promoters steht, der organspezifisch die R1-Genexpression in stärkepeichernden Geweben vermittelt.

15. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 13 bis 14, das eine Weizenpflanze betrifft.

16. Vermehrungsmaterial einer Pflanze nach einem oder mehreren der Ansprüche 10 bis 12 enthaltend Pflanzenzellen nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 8.

17. Verwendung von Nucleinsäuremolekülen, wie in Anspruch 1 definiert, zur Herstellung von monokotyledonen Pflanzen nach einem oder mehreren der Ansprüche 10 bis 12 oder von monokotyledonen Pflanzenzellen nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 8.

18. Stärke erhältlich aus einer Pflanzenzelle nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 8 oder einer Pflanze nach einem oder mehreren der Ansprüche 10 bis 12.

19. Stärke nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen im Vergleich zu Stärke aus entsprechenden Wildtyppflanzen erhöhten Phosphatgehalt in C6-Position der Glukosemonomere und/oder eine erhöhte Endviskosität aufweist.

20. Stärke, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen im Vergleich zu Stärke aus entsprechenden Wildtyppflanzen einen erhöhten Phosphatgehalt in C6-Position der Glukosemonomere und/oder eine erhöhte Endviskosität aufweist.

21. Stärke, dadurch gekennzeichnet, daß sie in C6-Position der Glukosemonomere einen Phosphatgehalt von mindestens  $0.1 \text{ nmol C6-P mg}^{-1}$  Stärke aufweist.

22. Stärke nach Anspruch 21 dadurch gekennzeichnet, daß sie eine um mindestens 50% erhöhte Endviskosität aufweist.

23. Stärke nach einem oder mehreren der Ansprüche 18 bis 22, dadurch gekennzeichnet, daß diese Stärke nach Verkleisterung Gele bildet, die im Vergleich zu Gelen von entsprechenden chemisch phosphorylierten Stärken gleichen Phosphatgehaltes in C6-Position der Glukosemonomere und/oder im Vergleich zu Gelen von Stärken aus entsprechenden nicht genetisch modifizierten Pflanzen eine erhöhte Gelfestigkeit aufweisen.

24. Stärke nach einem oder mehreren der Ansprüche 18 bis 23, dadurch gekennzeichnet, daß die Amylosekomponente dieser Stärke im Vergleich zur Amylosekomponente chemisch phosphorylierter Stärke einen verringerten Gesamtphosphatgehalt in der Amylosekomponente enthält.

25. Stärke nach einem oder mehreren der Ansprüche 18 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß sie im Vergleich zu chemisch phosphorylierter Stärke ein verändertes Phosphorylierungsmuster aufweist.

26. Stärke nach einem oder mehreren der Ansprüche 18 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um eine Weizenstärke handelt.

27. Verfahren zur Herstellung einer Stärke nach einem oder mehreren der Ansprüche 18 bis 26 umfassend die Extraktion der Stärke aus einer Pflanze nach einem oder mehreren der Ansprüche 10 bis 12.

28. Verwendung einer Stärke nach einem oder mehreren der Ansprüche 18 bis 26 im industriellen Bereich, vorzugsweise zur Herstellung von Lebensmitteln.

29. Weizenmehl, enthaltend eine Stärke nach einem oder mehreren der Ansprüche 18 bis 26.

## Zusammenfassung

Monokotyledone Pflanzenzellen und Pflanzen, die eine modifizierte Stärke synthetisieren

5

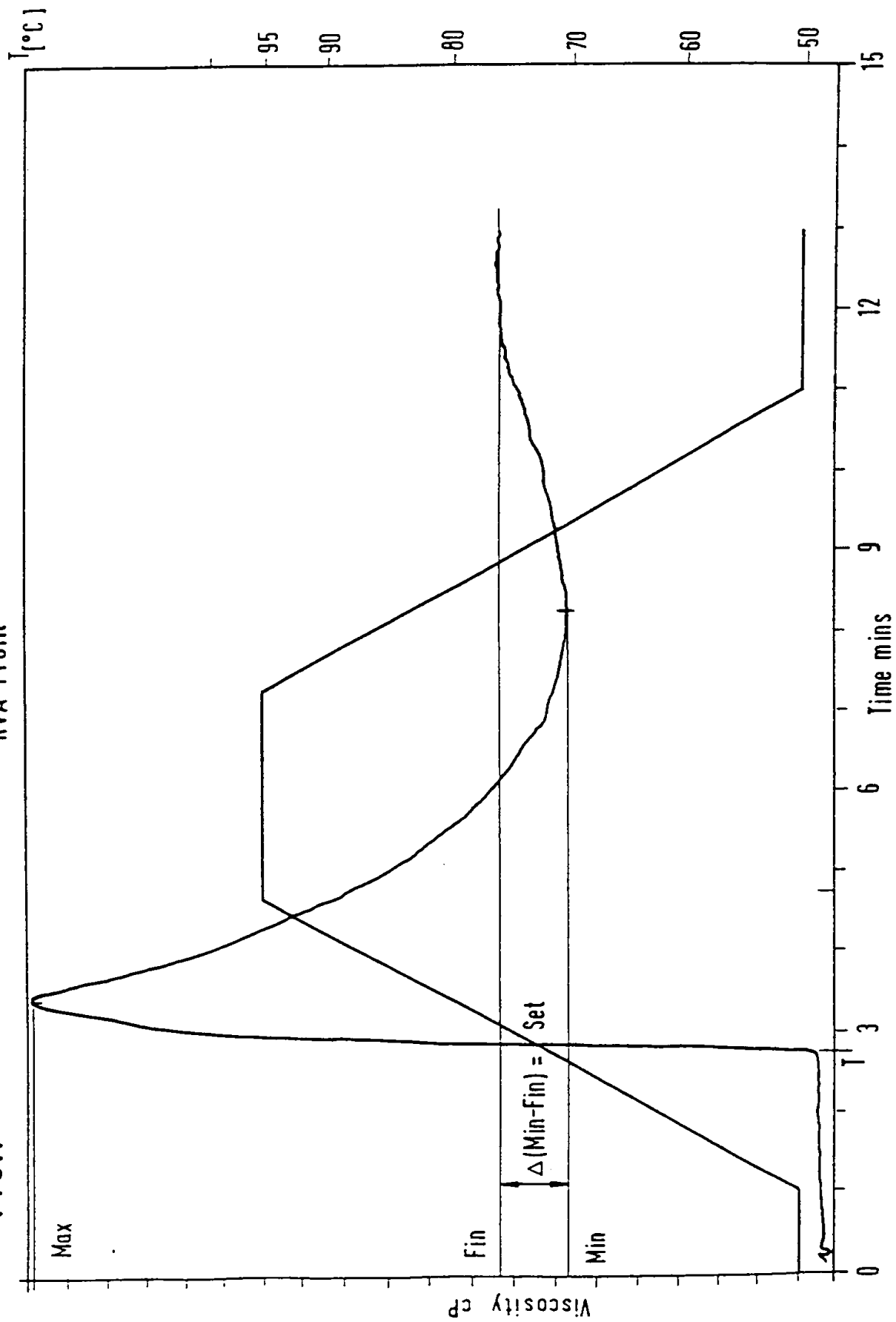
Die vorliegende Erfindung betrifft monokotyledone Pflanzenzellen und Pflanzen, die genetisch modifiziert sind, wobei die genetische Modifikation in der Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls besteht, das ein Protein mit der biologischen Aktivität eines R1-Proteins codiert. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Mittel und Verfahren zu deren Herstellung. Derartige Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisieren eine modifizierte Stärke, die dadurch gekennzeichnet ist, daß sie einen im Vergleich zu Stärke von entsprechenden nicht genetisch modifizierten monokotyledonen Pflanzen erhöhten Phosphatgehalt und/oder ein verändertes Phosphorylierungsmuster und/oder eine erhöhte Endviskosität im RVA-Profil und/oder eine erhöhte Gelfestigkeit im Texture Analyser aufweist. Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch die von den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisierte Stärke sowie Verfahren zur Herstellung dieser Stärke.

10

15

FIG.1

RVA-Profil



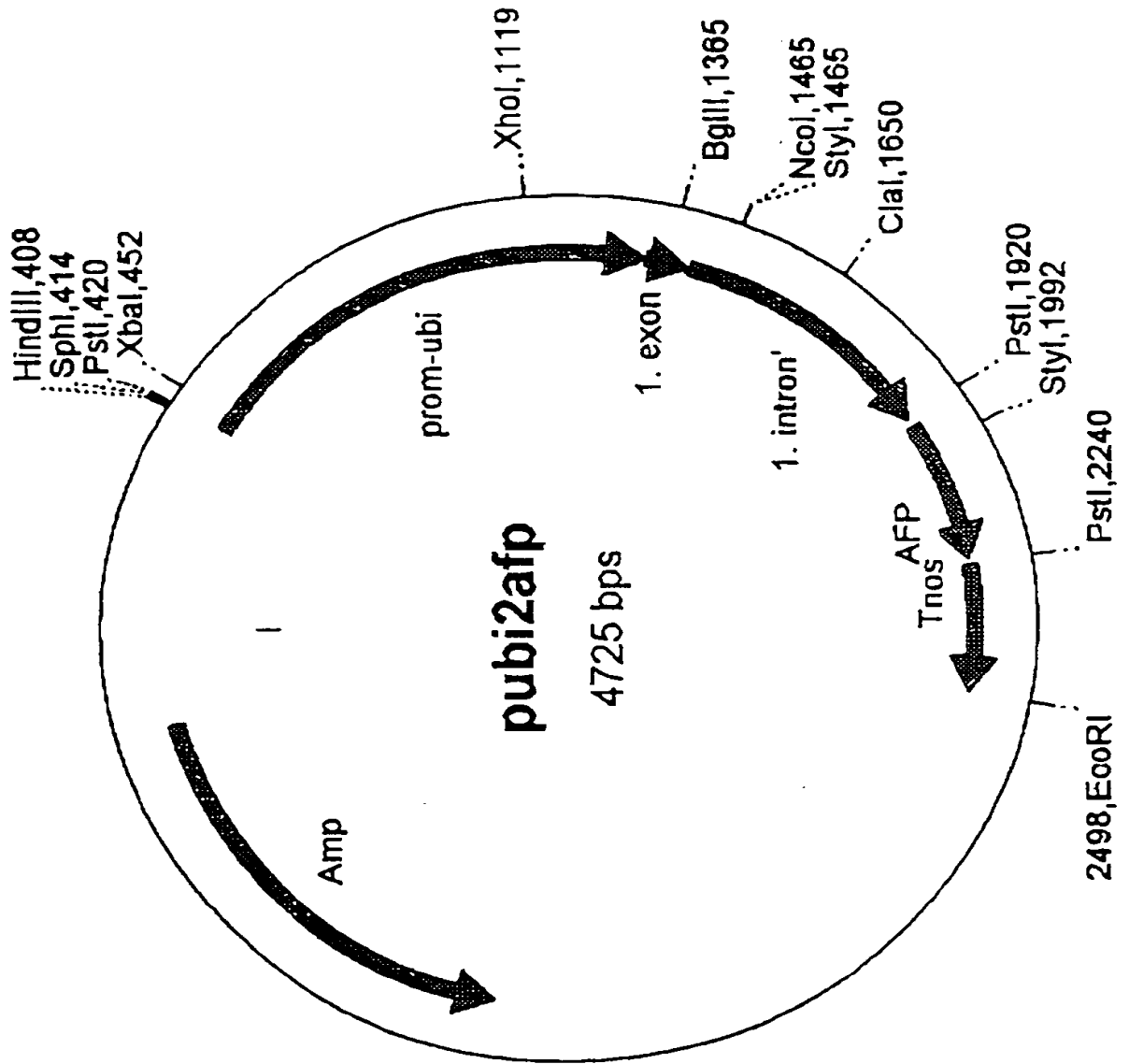


FIG.2

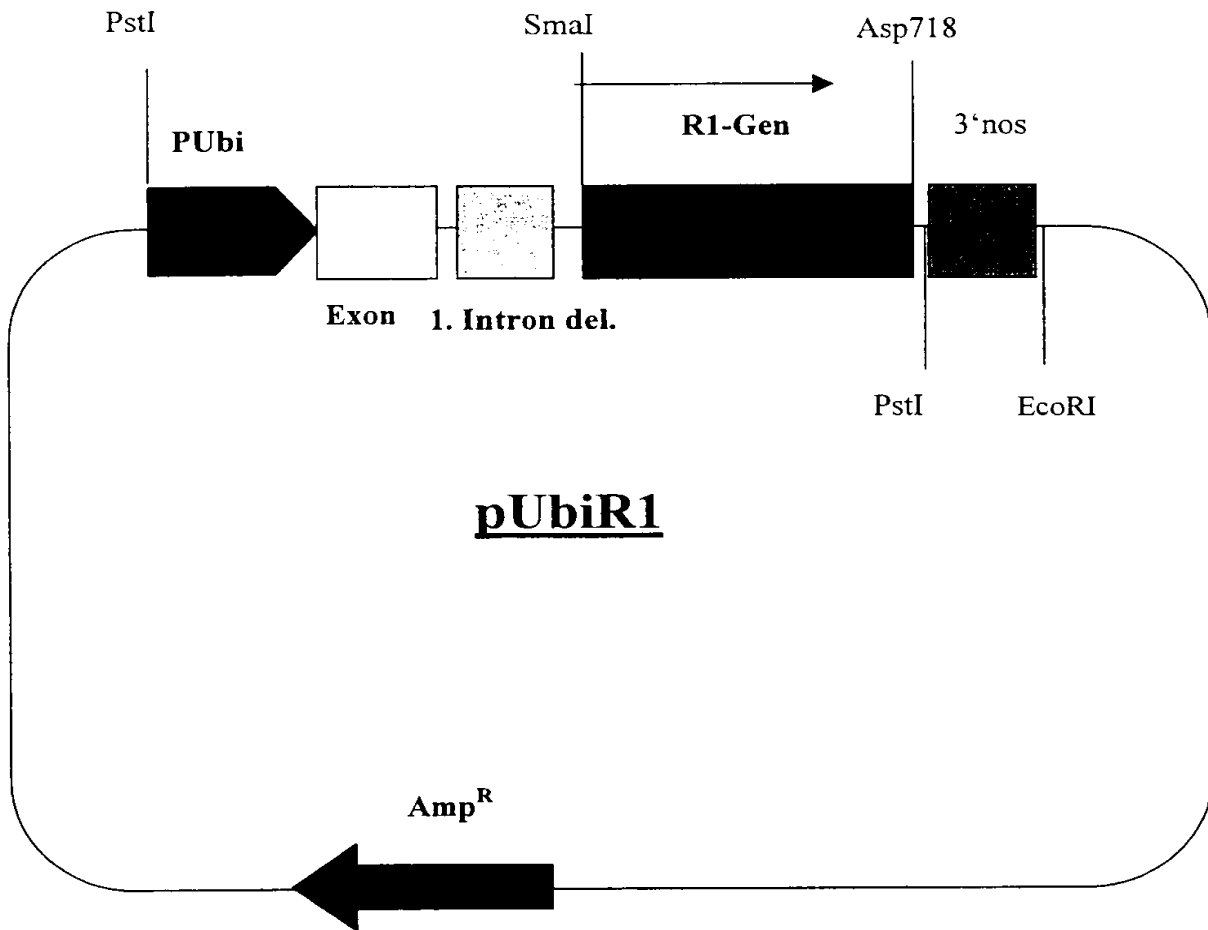


Fig. 3

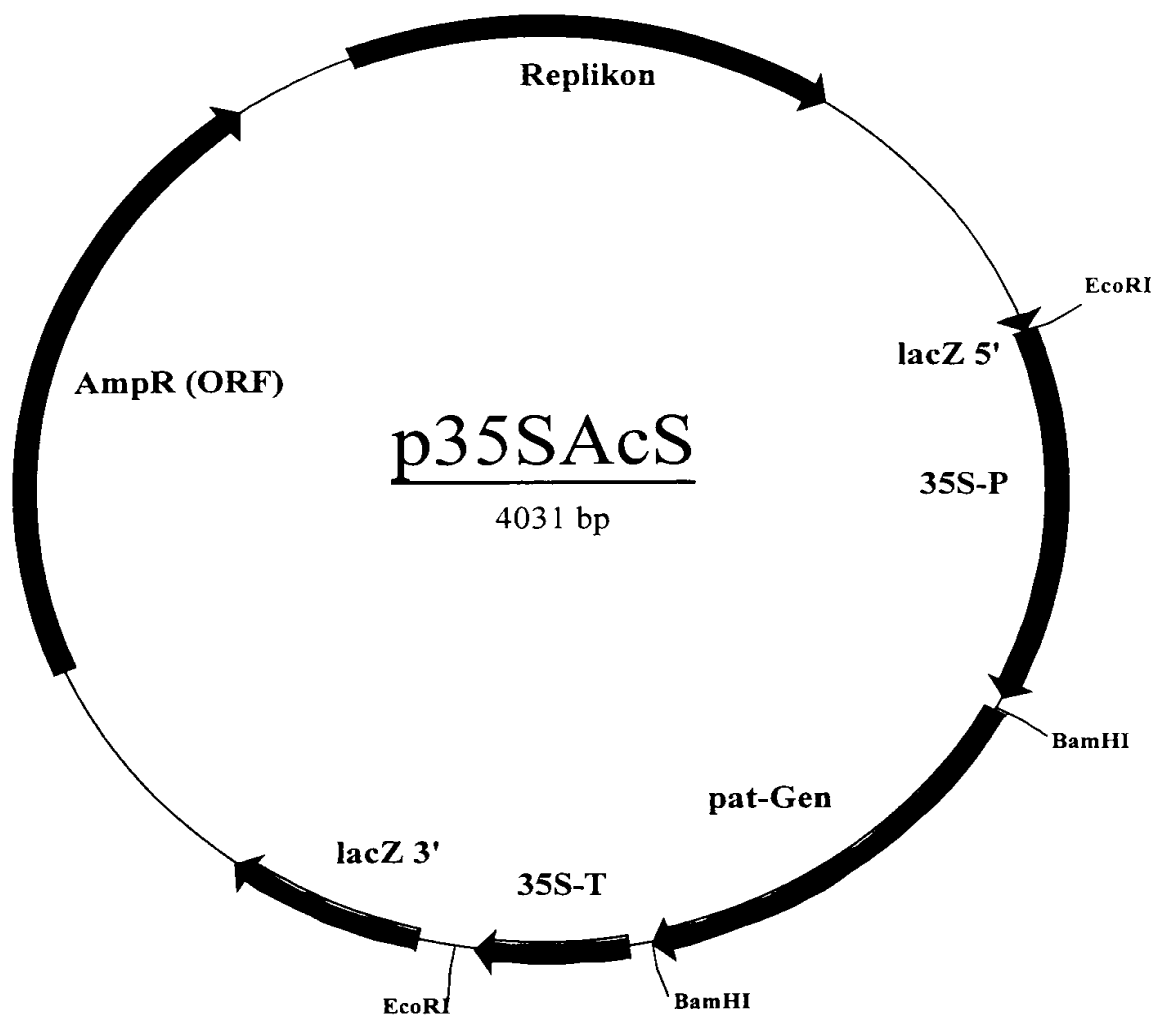


Fig. 4

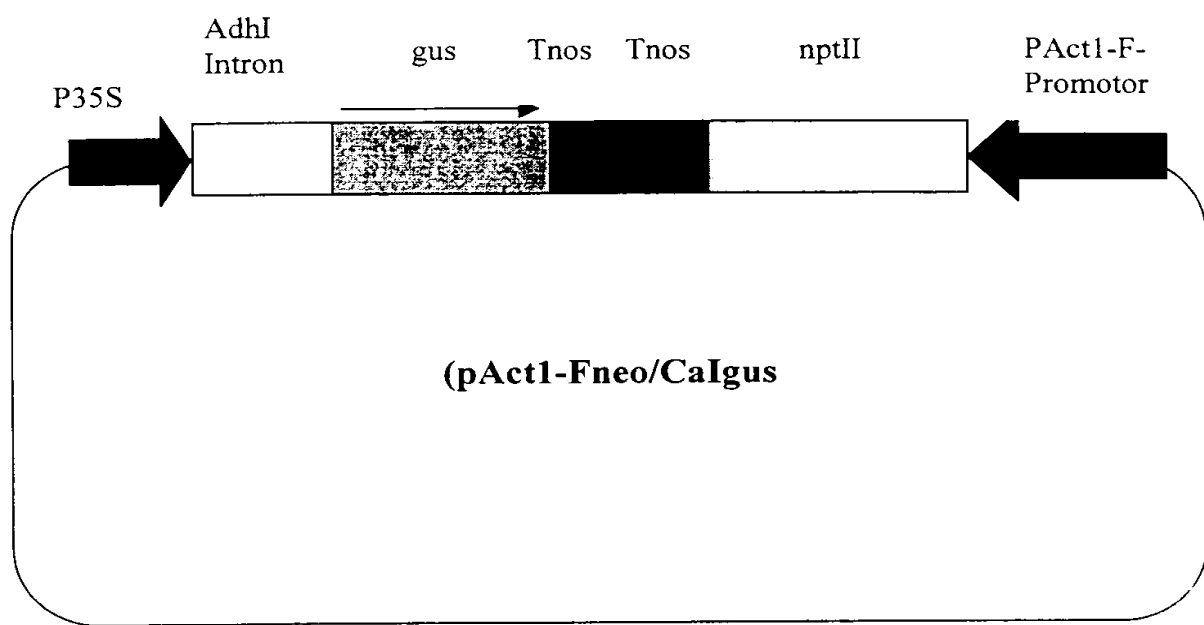


Fig. 5